

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Evaluación del potencial terapéutico de la reprogramación de los macrófagos tumorales en el mieloma múltiple

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandra Gutiérrez González

Directora

Paloma Sánchez-Mateos

Madrid, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO
DE LA REPROGRAMACIÓN DE LOS
MACRÓFAGOS TUMORALES EN EL
MIELOMA MÚLTIPLE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
Alejandra Gutiérrez González**

Madrid, 2016

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

**DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO
DE LA REPROGRAMACIÓN DE LOS
MACRÓFAGOS TUMORALES EN EL
MIELOMA MÚLTIPLE**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Alejandra Gutiérrez González

Directora

Paloma Sánchez-Mateos

Madrid, 2016

Informe de idoneidad del trabajo de investigación para optar al grado de doctor del director de la tesis doctoral

Nombre del Director del trabajo: Paloma Sanchez-Mateos

Nombre del Doctorando: Alejandra Gutiérrez González

Título del trabajo: Evaluación del potencial terapéutico de la reprogramación de los macrófagos tumorales en el mieloma múltiple

Paloma Sánchez-Mateos, profesora asociada de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y directora del trabajo de investigación titulado “Evaluación del potencial terapéutico de la reprogramación de los macrófagos tumorales en el mieloma múltiple”, realizado por Alejandra Gutiérrez González para optar al grado de doctor, emite el siguiente informe:

1

El trabajo de investigación se centra en el estudio de los macrófagos asociados al mieloma múltiple, que es la neoplasia hematológica más frecuente, y su posible uso como nueva diana terapéutica. Las células tumorales de mieloma se acumulan en la médula ósea donde interaccionan con el microambiente que favorece su supervivencia y permite la resistencia a los tratamientos y la recaída de la enfermedad. Los nuevos tratamientos frente al mieloma no sólo se dirigen a la célula tumoral, sino que se centran en bloquear sus interacciones con el microambiente de la médula ósea. Un componente muy importante del microambiente del mieloma son los macrófagos, que como en muchas otras neoplasias son reclutados activamente durante el desarrollo del tumor y desempeñan generalmente un papel protumoral. En este trabajo se han analizado las interacciones de células de mieloma con varios tipos de macrófagos humanos y se ha demostrado que dependiendo de su diferenciación/activación los macrófagos pueden favorecer o impedir el desarrollo del mieloma. Además, se han diseñado varios tratamientos dirigidos a modificar la función de los macrófagos para favorecer su papel anti-tumoral y evitar sus efectos pro-tumorales. Para demostrar la eficacia de los tratamientos dirigidos a reprogramar la función de los macrófagos se han usado modelos in vivo de esta enfermedad. En conjunto, este trabajo es idóneo para ser presentado y optar al grado de doctor porque es novedoso, tecnológicamente avanzado y los hallazgos son muy relevantes ya que todavía no se dispone de un tratamiento curativo para el mieloma múltiple.

ABREVIATURAS

4-IPP	4-yodo-6-fenil pirimidina, inhibidor de MIF
AMD3100	Inhibidor de CXCR4
AMPK	Proteín-quinasa activada por AMP
AnxV	Anexina V
BTZ	Bortezomib
CCX733	Inhibidor de CXCR7
CD14	Receptor de lipopolisacárido bacteriano
CD163	Receptor de hemoglobina/haptoglobina
CD74	Cadena invariante del MHC de clase II
Células NK	Células asesinas naturales o “natural killers”
CFSE	Carboxifluoresceín diacetato succinimidil ester
CG	Centros germinales
CMA	Citotoxicidad mediada por anticuerpos
CP	Células plasmáticas
CR	Calreticulina
CSB	p425 o “Chicago sky blue”, inhibidor de MIF
CSF-1r	Receptor de M-CSF
CXCR2	Receptor de la citoquina IL-8
CXCR4	Receptor de la citoquina CXCL12 o SDF-1
CXCR7	Receptor de la citoquina CXCL12o SDF-1
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGLN3	Gen del factor inducible por hipoxia 3 de la Familia egl-9
EMR	Enfermedad mínima residual.
FasL	Fas ligando.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (verde)
FOLR2	Gen del receptor de folato 2
FR β	Receptor de folato 2
FS	Fosfatidilserina.
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HSC	Células madre hematopoyéticas
ICAM3	Molécula de adhesión celular CD50
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
INHBA	Inhibina A
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LPS	Lipopolisacáridos bacterianos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MDSC	Célula supresora de origen mielóide
MGUS	Gammapatía monoclonal de origen incierto

ABREVIATURAS

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración
MM	Mieloma múltiple
MMEC	Célula endotelial derivada de MO de pacientes con MM
MMP	Metaloproteasa
MØ	Macrófago
MO	Médula ósea
MØ IL-4	Macrófago diferenciado en presencia de GM-CSF y estimulado con IL-4
MØ LPS/IFN	Macrófago diferenciado en presencia de GM-CSF y estimulado con LPS IFN- γ
MØ-GM	Macrófagos diferenciados en presencia de GM-CSF
4 MØ-M	Macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF
MSC	Célula mesenquimal
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
NSCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
NSG	Ratón de la cepa NOD SCID gamma
PHD3	Factor inducible por hipoxia 3 de la Familia egl-9
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB	Sobrenadante o medio condicionado
SB225002	Inhibidor de CXCR2
SCID	“Severe combined immunodeficiency disorder”
SEM	Desviación estándar
SiARN	ARN de interferencia
SMM	MM quiescente
TAM	Macrófago asociado a tumor
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF- α
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
YP	Yoduro de propidio

ÍNDICE

Informe del director de tesis	1
Abreviaturas	3
Resumen	13
Summary	17
Introducción	21
Mieloma Múltiple	23
Características generales	23
Evolución y fases	23
Incidencia	25
Tratamiento	25
Alteraciones genéticas del MM	26
Microambiente medular en el MM	26
Macrófagos	27
Características principales y estados de polarización	27
Citotoxicidad y fagocitosis mediada por macrófagos	31
Macrófagos y cancer; papel en la progresión del MM	33
TAM como diana terapéutica	36
Factor estimulador de colonias (M-CSF)	37
Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	39
Mecanismo de acción de MIF	43
Justificación e hipótesis	47
Objetivos	51
Materiales y Métodos	55
1. Muestras de paciente, líneas celulares y macrófagos	57
1.1 Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de macrófagos	58
1.2 Aislamiento de monocitos de ratón y diferenciación de macrófagos	58

ÍNDICE

8

1.3 Aislamiento de células primarias de pacientes con MM	59
1.4 Líneas celulares	59
2. Protocolo de repolarización <i>in vitro</i>	59
3. Co-cultivos y cultivos con medios condicionados	60
3.1 Co-cultivos directos (contacto célula-célula)	60
3.2 Co-cultivos en transwell (ausencia de contacto célula-célula)	60
3.3 Cultivos con medios condicionados	60
4. Análisis de muerte celular	60
5. Ensayos de proliferación celular	61
6. Ensayos de inhibición de citotoxicidad	61
7. Análisis de marcadores por citometría de flujo	62
8. Western blot	63
9. ELISA	64
10. Inmunofluorescencia	65
10.1 Muestras medulares	65
10.2 Ratones de xenotransplante de MM	66
11. Modelos murinos de xenotransplante de MM	67
11.1 Modelo sistémico	67
11.2 Modelo subcutáneo	67
12. Purificación de la población mieloide tumoral Cd11b ⁺ y de las células de MO de ratones NSG	68
13. Depleción de la población de macrófagos mediante liposomas de clodronato	68
14. Microscopía confocal multicolor	69
15. Imagen de células vivas por microscopía	69
16. Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR)	69
17. Otros reactivos	72
18. Análisis estadístico	72

ÍNDICE

Resultados	75
1. Diferenciación de MØ-GM y MØ-M y estudio comparativo de su función anti-tumoral o pro-tumoral en presencia de células tumorales de MM tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>	79
1.1 Características fenotípicas de los MØ-GM y MØ-M diferenciados <i>in vitro</i>	79
1.2 Estudio de la función anti-tumoral o pro-tumoral de los MØ-GM y MØ-M cultivados en presencia de las células de MM	81
1.3 Video-microscopía de los co-cultivos de las células de MM con los MØ-GM y MØ-M	83
1.4 Estudio comparativo del papel de los MØ-GM y MØ-M en la proliferación <i>in vitro</i> de las células de MM	85
1.5 Análisis <i>in vivo</i> del efecto de los MØ-GM y MØ-M en el desarrollo tumoral en ratones xenotransplantados con células de MM	86
1.6 Estudio <i>in vitro</i> de la respuesta de las células de MM cultivadas en presencia de varios estados de polarización de MØ y del fenómeno de cross-activación que ocurre entre ambas poblaciones cuando se encuentran en co-cultivo	89
1.6.1 Estudio comparativo de varios estados de polarización/activación de MØ en co-cultivo con las células de MM en presencia o ausencia de contacto celular	89
1.6.2 Estudio del factor TNF- α y de la citoquina IL-12 en la citotoxicidad mediada por los MØ-GM sobre las células de MM	91
1.6.3 Estudio de otras posibles moléculas implicadas en la citotoxicidad mediada por los MØ-GM	94

ÍNDICE

2. Estudio de marcadores de expresión asociados a polaridad de MØ	
M1/M2 en TAMs de aspirados de MO de pacientes con MM	99
3. Repolarización <i>in vitro</i> de los MØ desde un fenotipo M2 protumoral	
a un fenotipo M1 anti-tumoral mediante el uso de diferentes	
estrategias	105
3.1 Uso de estrategias combinadas en la repolarización <i>in vitro</i>	
de los MØ-M pro-tumorales mediante el uso de un estímulo	
pro-M1 y el bloqueo de señales pro-M2	105
3.2 Reprogramación <i>in vitro</i> de los MØ-M a nivel metabólico	
mediante la combinación de GM-CSF más 4-IPP	109
3.3 Ensayos funcionales de citotoxicidad de los MØ-M	
repolarizados en co-cultivo con las células de MM	110
3.4. Estudio de los receptores involucrados en la polarización de los	
MØ a través de MIF	112
3.4.1 Análisis de la expresión de los receptores de MIF en los	
MØ-M	112
3.4.2 Estudio de los diferentes receptores de MIF en el proceso	
de repolarización de los MØ	115
4. Análisis <i>in vivo</i> del efecto de la repolarización del MØ en modelos	
de MM en ratón	119
4.1 Eficacia terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP en	
modelos de ratón xenotransplantados subcutáneamente con células	
de MM	119
4.2 Estudio <i>in vivo</i> de la contribución del MØ en la respuesta	
terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP	121

ÍNDICE

4.3 Análisis de marcadores asociados a polaridad M1/M2 en la población de TAMs aislados de tumores de MM tratados con GM-CSF+4-IPP	122
4.4 Eficacia terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP en modelos de ratón xenotransplantados de forma intravenosa con células de MM.	123
4.5 Análisis de marcadores de polaridad M1/M2 en la población de macrófagos presentes en médula ósea	125
Discusión	127
Conclusiones	141
Bibliografía	147
Anexos	165
Publicaciones	167
Videos realizados por microscopía	183

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por la proliferación anormal de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea, gracias a la fuerte interacción y el sostén existente con la población de células estromales presentes en el microambiente medular. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) son elementos fundamentales en el desarrollo tumoral de la mayoría de tumores sólidos, pero también se ha descrito su importante papel en el progreso tumoral de las neoplasias hematológicas circulantes.

En el MM los TAMs son componentes cruciales del microambiente de la médula ósea a través del aporte de supervivencia y de resistencia a drogas que ejercen sobre las células tumorales. En los tumores ya establecidos, los TAMs generalmente representan una población polarizada de tipo M2, preferentemente mostrando funciones proangiogénicas y pro-tumorales.

El linaje monocito/macrófago se caracteriza por poseer una gran plasticidad, y se ha propuesto a los macrófagos (MØ) como una población que puede retener su habilidad de cambiar en respuesta a determinados estímulos y restablecer sus funciones anti-tumorales. En este trabajo se han investigado varias aproximaciones para reprogramar a los MØ pro-tumorales como una novedosa estrategia terapéutica en el MM.

En primer lugar, se encontró diferente capacidad de limitación/promoción tumoral entre varios tipos de MØ de tipo M1 y de tipo M2, respectivamente, cuando se mezclaron con células tumorales de MM tanto *in vitro* como *in vivo*. Los MØ de tipo M1 fueron capaces de inducir la muerte celular de las células de MM tanto de manera dependiente como independiente de contacto celular, en este último caso a través de la secreción de moléculas solubles como el TNF α o IL-12 aunque nuestros resultados sugirieron la existencia de factores adicionales involucrados en la muerte programada de las células de MM inducida por los MØ.

Por otro lado, los MØ de tipo M2 mostraron efectos protectores sobre las líneas celulares y las células primarias de MM, aportándoles supervivencia y resistencia frente una muerte inducida por drogas y/o espontánea. Análisis realizados mediante microscopía confocal sobre muestras de MO de pacientes con una alta infiltración de células CD138+/CD38+ revelaron que los MØ asociados al MM, detectados mediante la expresión de CD163, mostraron de

manera predominante un fenotipo M2, con una alta expresión de marcadores de este tipo como FR β o CD209, una baja expresión de los marcadores M1 TNF α , CLEC5A y EGLN3 y una moderada expresión de CD68. Por otra parte, se encontró una alta expresión del factor inhibidor de la migración de los M ϕ (MIF) así como una elevada expresión de su receptor de alta afinidad CD74.

14

Para conseguir reprogramar la naturaleza pro-tumoral de los TAMs asociados a MM hacia un M ϕ de tipo M1 anti-tumoral, primero se testó la citoquina pro-M1 GM-CSF, sin embargo ésta mostró efectos parciales en el proceso de repolarización. Por esta razón se usó la citoquina GM-CSF en combinación con el bloqueo de una señal pro-M2, como MIF o el factor estimulador de colonias (M-CSF), ambos abundantemente expresados en muchos tipos de cáncer y promotores de la polarización del M ϕ hacia un fenotipo M2. La combinación de GM-CSF junto con el inhibidor de MIF 4-IPP logró las mejores respuestas de repolarización de M2 a M1, tanto a nivel génico, como de proteína, así como notables efectos anti-tumorales. Además, esta doble combinación indujo respuestas terapéuticas en modelos xenogénicos de MM en ratones SCID y NSG, y este efecto beneficioso se demostró que era dependiente de la población de TAMs, ya que su depleción mediante el uso de liposomas de clodronato no permitió que se promoviera una reducción del volumen tumoral.

Al mismo tiempo, la purificación de la población de células mieloides Cd11b⁺ intratumorales mostró en estas células un aumento en la expresión de marcadores M1 con una recíproca disminución de marcadores M2 de un amplio panel de genes murinos de polaridad M1/M2.

Asimismo, se han definido a CXCR7 y a CD74 como los principales receptores de MIF implicados en el proceso de polarización ejercido por esta citoquina sobre la población de M ϕ de forma autocrina/paracrina.

En conjunto, nuestros resultados revelan el potencial terapéutico de la repolarización de los TAMs asociados a MM con funciones pro-tumorales hacia un fenotipo anti-tumoral mediante el uso de señales pro-M1 junto con el bloqueo de señales M2 en el contexto específico del MM.

Multiple myeloma (MM) is a malignant B-cell tumor characterized by proliferation of monoclonal plasma cells in the bone marrow (BM), where tumoral cells survive due to strong interaction with the stromal cells present in the microenvironment. Tumor associated macrophages (TAM) are key players in promoting tumor progression in mostly solid tumors but also in circulating hematological malignancies.

In MM, TAMs are important components of the bone marrow microenvironment that support malignant plasma cell survival and resistance to therapy. Within established tumors, TAMs are believed to represent an M2-polarized population, preferentially expressing M2 markers and showing pro-angiogenic functions.

17

Monocyte/macrophage lineage is characterized by being a high plastic population and has been proposed that macrophages (MØ) could retain the capacity to change in response to stimuli able to restore their antitumor functions. Here, we investigated several approaches to reprogram MØ as a novel therapeutic strategy in MM. First, we found different tumor-limiting/supporting potential between various monocyte-derived M1-like MØ and M2-like MØ, respectively, when mixed with MM cell lines *in vitro* and *in vivo*. M1-like MØ were able to induce MM cell death in a contact-dependent and independent manner, the later through the secretion of cytotoxic mediators such as TNF α or IL-12, but our results suggest the existence of other soluble molecules involved in MM-induced cell death.

On the other hand, M2-like MØ showed protective effects to MM cell lines and MM primary cells by supporting survival and resistance from drug or spontaneous-induced cell death. Analysis by multicolor confocal microscopy of the BM samples from MM patients with high CD138⁺/CD38⁺ infiltration revealed that MM associated MØ, detected by the expression of CD163⁺, displayed a predominant M2-like phenotype, with high expression of FR β and CD209, low expression of the M1-like markers TNF α , CLEC5A and EGLN3, and moderate expression of CD68. Furthermore, we found high expression of the pro-M2 cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) and also elevated presence of its high

affinity receptor CD74.

To reprogram the pro-tumoral M2-MØ nature of MM TAM towards anti-tumoral M1-MØ we first tested the pro-M1 cytokine GM-CSF, however, it showed partial effects on the repolarization process. Thus, we reasoned using the pro-M1 signal GM-CSF plus blockade autocrine/paracrine M2 signals, by inhibiting the cytokines MIF or macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), both abundant expressed in many cancer types and known to drive M2 polarization state. The combination of GM-CSF plus the MIF inhibitor 4-IPP achieved the best M2 towards M1 reprogramming responses, both at gene and protein expression levels, as well as remarkable tumoricidal effects. Furthermore, this combined treatment elicited therapeutic responses in MM SCID and NSG xenograft mice models and the beneficial effect was dependent on TAM population since MØ depletion through clodronate-liposomes treatment did not allowed tumor reduction. In addition, purification of intratumoral Cd11b⁺ cell population from treated mice with GM-CSF+4-IPP showed up-regulation of M1-associated markers and reciprocal down-regulation of M2 markers from a wide M1/M2 gene panel. Furthermore, we have defined CXCR7 and CD74 as the main receptors of MIF implicated in the polarization process executed by this cytokine over MØ population in an autocrine/paracrine manner.

Altogether, our results reveal the therapeutic potential of reprogramming MM TAM with protumoral functions to antitumoral phenotype using a pro-M1 signal plus blocking an M2 signal in the specific disease context of MM.

INTRODUCCIÓN

Mieloma Múltiple

Características generales

El Mieloma Múltiple (MM) es una enfermedad hematológica que se caracteriza por la acumulación clonal en la médula ósea (MO) de células plasmáticas (CP) tumorales productoras de anticuerpos. Estas CP o células B maduras se caracterizan por secretar altas cantidades de anticuerpos anormales o inmunoglobulinas monoclonales (proteína M o paraproteína) así como cadenas ligeras libres. Son células que presentan una alta supervivencia, pudiendo residir en la MO desde meses hasta incluso años. A pesar de las múltiples terapias que han sido desarrolladas en la última década, el MM sigue siendo una enfermedad incurable, debido a la recaída de la enfermedad originada por las células tumorales residuales, localizadas en nichos especializados de la MO, que resisten la terapia y vuelven a repoblar el tumor ([Lawson et al., 2015b](#)). Los factores más importantes en la patogénesis y recaída de esta enfermedad son los siguientes:

- Las lesiones genéticas presentes en los clones de las CP tumorales.
- El soporte y la supervivencia que aporta el microambiente de la MO a las células tumorales.

Evolución y fases

El MM es una neoplasia que experimenta su transformación en múltiples pasos. En prácticamente todos los casos, el MM se desarrolla a partir de un estado pre-tumoral denominado gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). MGUS es una afección benigna asintomática relativamente común, presente en aproximadamente un 3-4% de la población mayor de 50 años, con una incidencia que incrementa con la edad ([Bianchi and Munshi, 2015](#)). La base molecular por la que se produce la transformación de un estado MGUS a un estado tumoral de MM no se conoce con exactitud, existiendo un

riesgo de desarrollo de la enfermedad de aproximadamente un 1% al año (Kyle et al., 2002). MGUS se caracteriza por una concentración monoclonal de inmunoglobulinas (Ig) en suero o paraproteinemia menor de 3g/dL, y un porcentaje menor del 10% de infiltración de CP en la MO. Existen parámetros indicativos de riesgo hacia una condición tumoral como son la presencia de anormalidades genéticas, aneuploidías, la existencia de inmunoglobulinas monoclonales distintas a IgG y una cuantificación de proteína monoclonal mayor de 1.5g/dL. La amiloidosis asociada al MM es un tipo de complicación producida por el depósito de fragmentos de las Ig monoclonales (cadenas ligeras), que se pegan unas a otras y se acumulan en tejidos y órganos críticos como el hígado, riñón, intestino o corazón, generando daños orgánicos y complicaciones asociadas con algunos de los tratamientos utilizados en esta enfermedad (Bergsagel and Kuehl, 2005).

El MM quiescente (SMM) es un estadio intermedio, que puede aparecer entre el MGUS y el MM, aunque no siempre se desarrolla. Se trata de una alteración también asintomática pero que presenta un porcentaje de infiltración en MO >10% y un riesgo de desarrollo de la patología mayor que el estado MGUS (en torno a un 10% al año) (Kyle et al., 2007).

El MM se diferencia del MGUS por poseer un porcentaje mayor del 10% de infiltración tumoral en la MO. La progresión tumoral intramedular del MM está asociada con un incremento cada vez más severo de las características secundarias de la enfermedad como la anemia, inmunodeficiencia, fallo renal, hipercalcemia y múltiples lesiones óseas (Ghobrial, 2012), pudiendo llegar a producirse incluso en algunos pacientes el desarrollo de tumores extramedulares en otros órganos incluyendo la piel, pulmones, el intestino o el sistema nervioso central. El MM extramedular es un estado mucho más agresivo donde las células han perdido su dependencia por la MO, tratándose ya de una enfermedad altamente diseminada que pasaría a denominarse leucemia de células plasmáticas (Ghobrial, 2012).

Incidencia

El MM representa el 1% de todos los tumores malignos y el 13.4% de los tumores hematológicos a nivel mundial. La edad media en el momento del diagnóstico es de 65 años y menos del 15% de los pacientes se diagnostican por debajo de los 50 años. En la siguiente tabla se muestran los datos más recientes publicados en el año 2015 que recogen la incidencia a nivel mundial del MM en el año 2012 (Ferlay et al., 2015).

25

Nuevos casos/año			
	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
Casos (%)	114.000 (0.8%)	62.000 (0.8%)	52.000 (0.8%)
Incidencia estandarizada por edad	1.5	1.7	1.2
Riesgo acumulado	0.2	0.2	0.2
Muertes/año			
	Ambos sexos	Hombres	Mujeres
Muertes (%)	80.000 (1%)	43.000 (0.9%)	37.000 (1%)
Incidencia estandarizada por edad	1	1.2	0.8
Riesgo acumulado	0.1	0.1	0.1

Tabla 1. Datos de incidencia del MM a nivel mundial. Riesgo acumulado hasta los 74 años de edad.

Tratamiento

El porcentaje de respuesta y supervivencia de los pacientes con MM ha mejorado considerablemente debido a la introducción de nuevos agentes en su tratamiento, que hacen diana tanto en las células tumorales como en el microambiente de la MO, como el inhibidor del proteasoma bortezomib, o las drogas inmunomoduladoras talidomida y lenalidomida

(Hideshima et al., 2008; Richardson et al., 2009). En un amplio estudio realizado en el año 2008, el tratamiento con estas nuevas drogas indujo una mejoría en un 50% de los casos (Kumar et al., 2008). A pesar de esto, el MM sigue siendo una enfermedad incurable debido a la resistencia que desarrollan las células tumorales a estas drogas, probablemente por el fuerte sostén y alta supervivencia que les aporta el microambiente medular.

Por esta razón se necesita desarrollar nuevas drogas y estrategias dirigidas no solamente al tratamiento de las células tumorales sino también hacia las células constituyentes de este microambiente medular (Kawano et al., 2015).

Alteraciones genéticas del MM

El MM es una patología con una alta presencia de anomalías genéticas que incluyen aneuploidías (cambio en el número cromosómico), translocaciones cromosómicas (en zonas donde se encuentran oncogenes muy importantes como MMset, MAF, MAFB y las ciclinas D1 y D3), inserciones, deleciones, modificaciones epigenéticas y mutaciones somáticas puntuales. Dentro de estas mutaciones puntuales, las más presentes y relevantes del MM son las que afectan a KRAS, NRAS, TP53, BRAF y FAM46C, aunque cada año se identifican nuevas alteraciones genéticas (Bolli et al., 2014). Cerca del 80% de las modificaciones genéticas que aparecen en patologías asociadas a linfocitos B parecen comenzar en los centros germinales (CG) de los órganos linfoides secundarios, donde se llevan a cabo los procesos de recombinación e hipermutación somática, necesarios para la generación de CPs maduras con receptores de alta afinidad hacia antígenos específicos. En MM la inestabilidad genética que se produce en los CG es muy importante para el desarrollo de la patología (Ghobrial, 2012; Kuehl and Bergsagel, 2002).

Microambiente medular en el MM

La interacción entre las células de MM y el estroma de la MO constituye la base de la patogénesis del MM. El conjunto de células, matriz extracelular y factores solubles que forman el estroma de la MO se conoce con el nombre de microambiente medular, lugar

donde residen las células madre hematopoyéticas (HSC). Este microambiente está integrado por numerosos tipos celulares además de las HSC y de los precursores de los distintos linajes hematopoyéticos, como células endoteliales, mesenquimales, osteoblastos, osteoclastos, células NK, linfocitos B y T y células mieloides que secretan múltiples factores, citoquinas y quimioquinas y que junto a la matriz extracelular forman el nicho hematopoyético (Hideshima et al., 2007). En el MM, la supervivencia, proliferación, resistencia a drogas y migración de las CPs tumorales es aportada mediante interacciones bidireccionales (tanto directas como mediante citoquinas que activan vías de señalización) que existen entre las células tumorales y el microambiente de la MO, donde los macrófagos (MØ) representan un componente crucial en la progresión tumoral de esta patología (Ribatti, 2013). Estos MØ presentes en el nicho tumoral están expuestos a gran cantidad de señales provenientes del microambiente medular que colaboran en dotar a estas células inmunes de actividades pro-tumorales. En el MM se ha descrito a los MØ como células clave en el mantenimiento e inducción de un microambiente de carácter tumoral en la MO (Berardi et al., 2013).

27

Macrófagos

Características principales y estados de polarización

Los MØ son componentes celulares claves del linaje mielóide-monocítico con un importante papel en la inmunidad innata. Se encargan de detectar y responder a organismos invasores en la sangre y tejidos y de desencadenar complejas respuestas inflamatorias que en última instancia conducen a la eliminación del agente patógeno mediante fagocitosis y la restauración de la homeostasis (Biswas et al., 2012). Los monocitos generalmente se consideran como una etapa de desarrollo intermedio entre sus precursores presentes en la MO y los MØ de tejido, sin embargo, los monocitos circulantes tienen importantes funciones efectoras, tanto manteniendo la homeostasis mediante el patrullaje y funciones reparadoras, como durante las infecciones ejerciendo funciones inflamatorias (Geissmann et al., 2010). Aunque la mayoría de las poblaciones de MØ residentes de tejido se originan a partir de precursores embrionarios o extraembrionarios (saco vitelino), existen tejidos como la dermis

o el intestino que contienen poblaciones de MØ adultos derivados de monocitos (Wynn et al., 2013). Durante los procesos de infección, los monocitos de sangre periférica migran hacia las zonas inflamadas donde se diferencian en MØ maduros capaces de eliminar el patógeno y restaurar la integridad del tejido (Davies et al., 2013). Además de su participación en remodelación del tejido, fagocitosis e inflamación, los MØ son importantes reguladores del metabolismo y también presentan funciones inmunoregulatoras.

El linaje monocito-macrófago siempre se ha considerado heterogéneo y esto es debido a la enorme plasticidad y versatilidad que presentan estas células, ya que dependiendo de las señales que reciban del microambiente en el que se encuentren se generan diferentes estados de polarización (Sica and Mantovani, 2012). La polarización de los MØ difiere en términos de expresión de receptores, funciones efectoras y metabólicas y en cuanto al patrón de secreción de citoquinas y quimioquinas (Biswas and Mantovani, 2010; Mantovani et al., 2002). Aunque los estímulos procedentes del microambiente son muy diversos y como resultado existen incontables fenotipos funcionales de MØ, para facilitar el estudio de estas células se ha propuesto la existencia de dos estados principales de polarización, que representan los extremos de este amplio espectro de fenotipos, los MØ-M1 o clásicamente activados y los MØ-M2 o alternativamente activados (**Figura 1**). Los MØ-M1 son inducidos mediante citoquinas derivadas de células Th1, como el interferón gamma (IFN- γ), ligandos TLR, factores derivados de bacterias (LPS), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), citoquina que utilizaremos en este trabajo para su diferenciación (**MØ-GM**), generando un MØ pro-inflamatorio y anti-tumoral. Por otro lado, los MØ-M2 son el resultado de su exposición a citoquinas derivadas de células Th2 como IL-4 o IL-13, IL-10, glucocorticoides, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), mediante inmuno complejos o el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), citoquina que usaremos en este estudio para la generación del **MØ-M** anti-inflamatorio, pro-tumoral y pro-angiogénico (Biswas et al., 2012; Biswas and Mantovani, 2010).

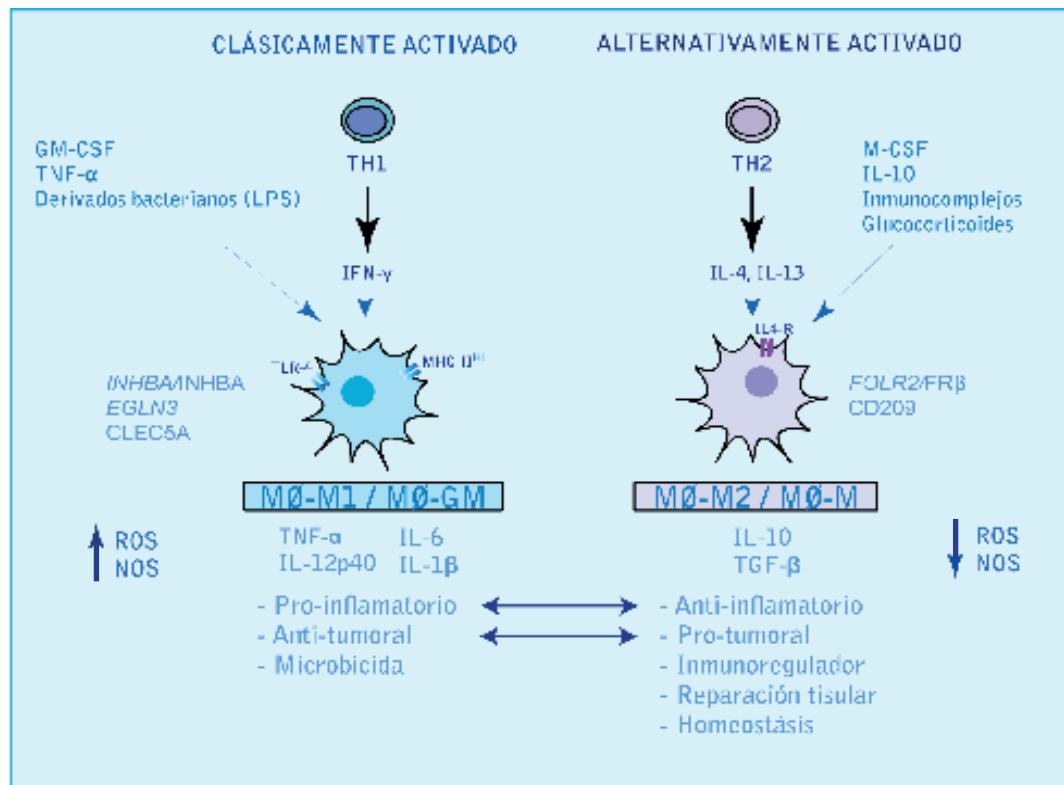


Figura 1. Esquema representando los estados de polarización de MØ-M1 y M2. En el dibujo se muestran las señales y citoquinas inductoras de polarización y el perfil secretor de citoquinas en cada caso, así como las características fenotípicas y funcionales de cada tipo de MØ.

Por lo tanto, los MØ-M1 son un componente celular crítico de la respuesta inflamatoria, secretando altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-23, IL-12 o IL-1β, y de la inmunidad tumoral, mostrando una importante actividad citotóxica a través de múltiples mecanismos que incluyen la secreción de IFN-γ, alta producción de intermediarios de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) o secreción de TNFα. Hay que destacar que los MØ-M1 son capaces de iniciar respuestas inmunes adaptativas anti-tumorales a través de la elevada expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de moléculas coestimuladoras para una eficiente presentación antigénica y que junto con la secreción de moléculas inflamatorias estimulan la respuesta citotóxica de células T y NK (Noy and Pollard, 2014).

De manera opuesta, los MØ-M2 producen altas cantidades de la citoquina IL-10, expresan generalmente bajos niveles de ROS y NOS, tienen menor capacidad para presentar antígenos y son capaces de suprimir la inmunidad anti-tumoral mediante funciones inmunoreguladoras que ayudan a la progresión tumoral. También participan en la reparación y remodelación

de los tejidos, proceso necesario para el restablecimiento de una correcta homeostasis. Secretan factores y citoquinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), M-CSF, IL-8 y la metaloproteasa 9 (MMP-9) que promueven funciones como angiogénesis, linfangiogénesis y fibrosis, necesarias para la reparación de tejidos y remodelación de la matriz extracelular, lo que en estados alterados contribuye a la invasión, progresión tumoral y metástasis (Gordon and Martinez, 2010).

Los MØ-M1 y M2 también presentan características diferenciales en relación al metabolismo de la glucosa, lípidos, aminoácidos y del hierro. En cuanto al metabolismo de la glucosa, se ha descrito que los MØ-M1 polarizados en respuesta a LPS/IFN- γ utilizan la vía glicolítica, es decir, el piruvato producido en la glicólisis en lugar de entrar en el ciclo de krebs y posterior fosforilación oxidativa se metabolizaría a lactato, incluso en presencia de oxígeno disponible (Kelly and O'Neill, 2015). Además, la actividad de la cadena respiratoria se encuentra atenuada en estas células, lo que permite la generación de ROS, y la vía de las pentosas fosfato se encuentra inducida, lo que contribuye a la generación de NADPH así como de la oxidasa de NADPH, también importantes para la producción ROS y de óxido nítrico, productos requeridos para la actividad citotóxica del MØ (Galvan-Pena and O'Neill, 2014). En cambio, la mayoría de los procesos que dirigen el cambio glicolítico descrito en los MØ-M1 se encuentran inhibidos en los MØ-M2, los cuales utilizan la oxidación de los ácidos grasos y la vía del metabolismo oxidativo para la obtención de energía, siempre que las condiciones de oxígeno sean normales (Kelly and O'Neill, 2015). En los MØ-M2 el piruvato obtenido en la glicólisis no formaría lactato sino que entraría en el ciclo de krebs y posteriormente se realizaría la fosforilación oxidativa.

Otra diferencia metabólica que presentan ambos tipos de MØ es en los niveles de activación de la enzima proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que funciona como un sensor energético en la célula y cuya actividad se opone al cambio metabólico glicolítico. Además de su papel en la conservación energética de la célula se ha visto que AMPK puede regular la función inflamatoria de los macrófagos (Sag et al., 2008). Una estimulación en los MØ mediante señales anti-inflamatorias como IL-10 o TGF β conduce a una fosforilación (y activación) de AMPK. Por el contrario, estímulos inflamatorios como LPS causan una desfosforilación (e

inactivación) de la proteína. Esto hace que exista una mayor fosforilación/activación de esta proteína en los MØ-M2 comparado con los MØ-M1 (Kelly and O'Neill, 2015).

Citotoxicidad y fagocitosis mediada por MØ

Los MØ son capaces de inducir la muerte en las células tumorales a través de diversos mecanismos, que pueden requerir de contacto célula-célula o bien mediante mecanismos independientes de contacto celular, por medio de la secreción de mediadores citotóxicos que incluyen TNF- α , NOS, ROS, proteasas, otros miembros de la familia de TNF como TRAIL o FasL, activina... (Klimp et al., 2002; Sierra-Filardi et al., 2011). Entre los mecanismos dependientes de contacto celular juegan un papel importante las moléculas de adhesión celular como la familia de integrinas CD11/CD18 que median el contacto entre la célula tumoral y el MØ, y cuyo bloqueo reduce la capacidad tumoricida del MØ (Bernasconi et al., 1991). Los MØ se consideran hoy en día uno de los efectores críticos en las terapias mediadas por anticuerpos en cáncer, esto es debido al enorme potencial que presentan estas células para causar una destrucción del tumor mediante el proceso de fagocitosis mediada por anticuerpo (FMA). Es un proceso dependiente de contacto célula-célula en el que se necesita la presencia de anticuerpos que reconozcan antígenos tumorales. El anticuerpo unido a la superficie de la célula tumoral es reconocido por los receptores RFc, que reconocen el fragmento Fc del anticuerpo, permitiendo un íntimo contacto célula-célula y que finaliza con la muerte de la célula tumoral (Weiskopf and Weissman, 2015). El uso de técnicas de microscopía confocal ha permitido visualizar como en los tratamientos con anticuerpos dirigidos frente a células tumorales el principal mecanismo efector de destrucción de estas células tumorales circulantes unidas al anticuerpo terapéutico es la fagocitosis mediada por macrófagos (Gul et al., 2014; Gul and van Egmond, 2015). Pero también se ha visto que los MØ poseen mecanismos de inducción de muerte por fagocitosis sobre la célula tumoral que son independientes del tratamiento con anticuerpos, proceso que se conoce con el nombre de fagocitosis primaria o fagoptosis, en el cual los MØ son capaces de fagocitar células viables sometidas a algún tipo de estrés, como es el caso de las células tumorales (Brown and Neher,

2012).

Este proceso se ha caracterizado como uno de los principales mecanismos de muerte ejercidos por los MØ y es un mecanismo que depende de las señales “cómeme” y/o pérdida de las señales “no me comas” ambas expuestas en la superficie de las células (Brown and Neher, 2012; Chao et al., 2012). La señal “cómeme” mejor caracterizada es la fosfatidilserina (FS), molécula que normalmente se encuentra en el interior celular en células viables gracias a una translocasa dependiente de ATP que bombea la FS desde el exterior al interior celular (Fadok et al., 2001; Ravichandran, 2011). Sin embargo, un fosfolípido activado por calcio denominado escramblasa puede exponer de nuevo la FS en la superficie de la célula en respuesta a diferentes señales como puede ser una depleción del ATP celular, un aumento de calcio, rotura de la membrana celular (necrosis) o estrés oxidativo. Una vez en la superficie celular, la FS se unirá a sus receptores presentes en la superficie de los MØ, y se desencadenará el proceso de fagocitosis (Mirnikjoo et al., 2009a, b; Tyurina et al., 2007). Otra señal “cómeme” de alta importancia es la calreticulina (CR), normalmente asociada al retículo endoplásmico (RE) pero que en condiciones determinadas, como en inflamación o procesos cancerígenos, se libera a la superficie de la célula, y mediante su unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad presente en el MØ se promueve el proceso de fagoptosis (Gardai et al., 2005). Recientemente se ha descrito también la expresión y/o secreción de CR por parte de los MØ (en mayor medida por los MØ de tipo M1) pudiendo desencadenar el proceso de muerte por fagocitosis en las células tumorales incluso en ausencia de expresión de CR por parte de estas últimas (Feng et al., 2015). Por otro lado, la evasión de la fagocitosis es un proceso necesario por parte de las células tumorales para lograr la supervivencia y crecimiento tumorales (Chao et al., 2012; Willingham et al., 2012). Se ha visto que la mayoría de los tumores expresan CD47, señal “no me comas”, en la superficie celular y que mediante su unión a SIRPα, presente en la superficie de los MØ y células dendríticas, se inhibe el proceso de fagocitosis (Willingham et al., 2012).

Los MØ son capaces de distinguir entre células de naturaleza tumoral y las que no lo son, siendo las diferencias existentes en la composición de la membrana celular las responsables de este reconocimiento específico de las células tumorales. La diferente cantidad de FS en la

membrana celular externa entre las células tumorales y no tumorales es una de las principales características responsables del reconocimiento tumoral por parte de los MØ y su posterior fagocitosis (Elnemr et al., 2000; Utsugi et al., 1991). Otros mecanismos de distinción de la célula tumoral incluyen alteraciones en la glicosilación de las moléculas superficiales, como el antígeno carcinoembriónico o el antígeno Tn, carbohidratos reconocidos por los MØ (Ganguly et al., 2003; Takano et al., 1990).

Macrófagos y cáncer; papel en la progresión del MM

Los MØ son el componente leucocitario más abundante del microambiente tumoral y se conocen con el nombre de “MØ asociados a tumor” (TAM). Se ha visto que en los estadios mas avanzados del tumor los MØ presentan generalmente un fenotipo M2, con alta expresión de IL-10 y baja expresión de IL-12 y que estos TAMs ayudan a promover la angiogénesis y la proliferación de las células tumorales beneficiando su desarrollo (Mantovani et al., 2002; Quail and Joyce, 2013). Los TAMs aislados de tumores establecidos de metástasis tanto de ratón como de humano normalmente presentan características de MØ de tipo M2 (“M2-like”) (Biswas and Mantovani, 2010). Asimismo, se han establecido relaciones funcionales entre el número de MØ presentes en el tumor y la progresión de éste en varios modelos murinos de cáncer, así como en diversos tipos de cáncer humano como son el de mama, próstata, cérvix o vejiga, en los cuales una alta infiltración de TAM se correlaciona con un mal pronóstico (Biswas et al., 2012). De hecho, estudios realizados en glioma y en cáncer de mama han mostrado como los TAMs facilitan la invasión tumoral a través de señales paracrinas que engloban al factor M-CSF y al factor de crecimiento epidérmico EGF (Quail and Joyce, 2013).

Dentro del tumor, los TAMs son los mayores productores de proteasas, como las metaloproteasas o las catepsinas (cisteín, serin y aspartil-proteasas), las cuales participan en el cambio angiogénico que activa la vasculatura en el tumor (“angiogenic switch”) apoyando la progresión tumoral (Bergers et al., 2000; Quail and Joyce, 2013).

Los TAMs generalmente provienen de precursores monocíticos que migran hacia la zona tumoral atraídos por determinadas quimioquinas (Qian and Pollard, 2010). Existe un cambio

dinámico en el fenotipo de los TAMs durante la progresión tumoral, lo que puede explicar el estado de activación mixto que se encuentran en algunos tumores ya establecidos (Laoui et al., 2014). En estadios tempranos de algunos tipos de cáncer, como el de estroma gastrointestinal, se ha visto que los TAMs presentan un fenotipo M1 o un fenotipo intermedio entre M1/M2 en el caso del cáncer de mama, sin embargo, en tumores sólidos avanzados tanto de ratón como de humano, la secreción de citoquinas como IL-13, IL-4, VEGF o angiopoyetina-2 y señales metabólicas como la hipoxia o el ácido láctico generan normalmente la polarización del TAM hacia un fenotipo M2, secretor de altas cantidades de IL-10 y TGF- β (Bronte and Murray, 2015). Estudios realizados en modelos de ratón han mostrado como la hipoxia, la cual se correlaciona con estadios avanzados tumorales, puede regular la polarización de los TAM hacia un fenotipo M2 con características angiogénicas e inmunosupresoras (Laoui et al., 2014b).

Los TAMs asociados a MM son componentes fundamentales del estroma medular y son reclutados y activados en el nicho tumoral mediante la secreción de quimioquinas y otros factores por parte de las células plasmáticas tumorales (Asimakopoulos et al., 2013). Varios trabajos en MM han demostrado que existe una correlación directa entre el porcentaje de infiltración de células CD163+ en MO con un peor pronóstico (Panchabhai et al., 2016; Suyani et al., 2013). Estudios realizados *in vitro* han mostrado como la interacción célula-célula entre MØ provenientes de monocitos tratados con M-CSF y las células de MM activa señales que protegen a estas células tumorales frente a una apoptosis inducida, mediante el tratamiento con drogas como bortezomib, y que por lo tanto, contribuyen al desarrollo de los fenómenos de resistencia a drogas (Zheng et al., 2009). Estudios posteriores mostraron que esta resistencia a drogas se debía en gran medida a la interacción que se producía entre los MØ y las células de MM a través de la unión entre los pares de proteínas de membrana PSGL-1/selectinas y CD18/ICAM-1 (Zheng et al., 2013). Además, se vio que el contacto celular directo entre estas dos poblaciones inducía en las células tumorales por un lado las vías p-Erk 1/2 y Bcl-xL, y por otro lado, se inhibía la caspasa-3, permaneciendo c-PARP de manera activa en las células de MM (**Figura 2**) (Hebron et al., 2013; Zheng et al., 2013). Asimismo, los TAMs son capaces de proteger a las células de MM de la apoptosis espontánea también

a través de mecanismos independientes de contacto celular (Kim et al., 2012b). En cuanto al desarrollo tumoral, se ha visto que los MØ inducen la proliferación de las células de MM *in vitro* cuando se encuentran en co-cultivo y que esta proliferación se ve incrementada en mayor medida cuando se cultivan además en presencia de células estromales mesenquimales (MSCs) (Kim et al., 2012b).

El MM es un cáncer altamente vascularizado y se ha visto que existe una mayor densidad vascular en pacientes con un MM activo comparado con pacientes con SMM o MGUS (Rajkumar et al., 2000). Análisis en muestras de pacientes de MO han revelado que una mayor infiltración de células CD163+ esta asociada con una mayor densidad vascular y por lo tanto, con peor pronóstico (Suyani et al., 2013). De hecho, MØ estimulados con los factores VEGF y bFGF, ambas muy abundantes en el microambiente de la MO, se transforman en células muy similares a las células endoteliales derivadas de MO de pacientes con MM (MMECs) y son capaces de generar redes capilares mimetizando la función de estas MMECs provocando un “mimetismo vasculogénico” (Scavelli et al., 2008).

Pero los TAMs inducen la progresión del MM no sólo a través de la angiogénesis, inhibición de la apoptosis y aporte de supervivencia a la célula tumoral sino también mediante la inmunosupresión. Se ha visto que las células supresoras de origen mieloide (MDSCs), población heterogénea de células mieloides con alta capacidad para suprimir la respuesta de células T, se encuentran incrementadas en pacientes con un MM en estado activo comparado con pacientes MGUS o con pacientes control (Brimnes et al., 2010; Gorgun et al., 2013).

Todos los estudios realizados apoyan la hipótesis de que los MØ son un componente crucial en el microambiente del MM y que tienen un papel clave en el desarrollo y propagación de esta patología promoviendo angiogénesis, vasculogénesis, proliferación y supervivencia de las CPs tumorales (**Figura 2**). Sin embargo, existen estudios en los que se revela el potencial papel anti-tumoral que pueden llegar a tener estos TAMs, en los cuales la inhibición de señales “no me comas”, que presentan las células tumorales a través de la expresión de CD47, hizo incrementar de forma significativa la fagocitosis de las CPs por parte de los MØ, resultando en una regresión del tumor en modelos murinos de MM (Kim et al., 2012a). Otro estudio mostró como la activación de MØ murinos mediante la administración de un agonista de

CD40 y una activación secuencial de receptores TLR incrementó la capacidad antitumoral de los MØ hacia las células de MM (Jensen et al., 2015). Además, los MØ activados por vías Th1 son mediadores importantes de la respuesta citotóxica de los linfocitos T-CD4+ en modelos murinos de MM (Tveita et al., 2015). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de explorar el posible papel anti-tumoral de los TAMs en el MM y la necesidad de diseñar tratamientos que nos permitan re-educar estas células pro-tumorales hacia un fenotipo M1 citotóxico y anti-tumoral.

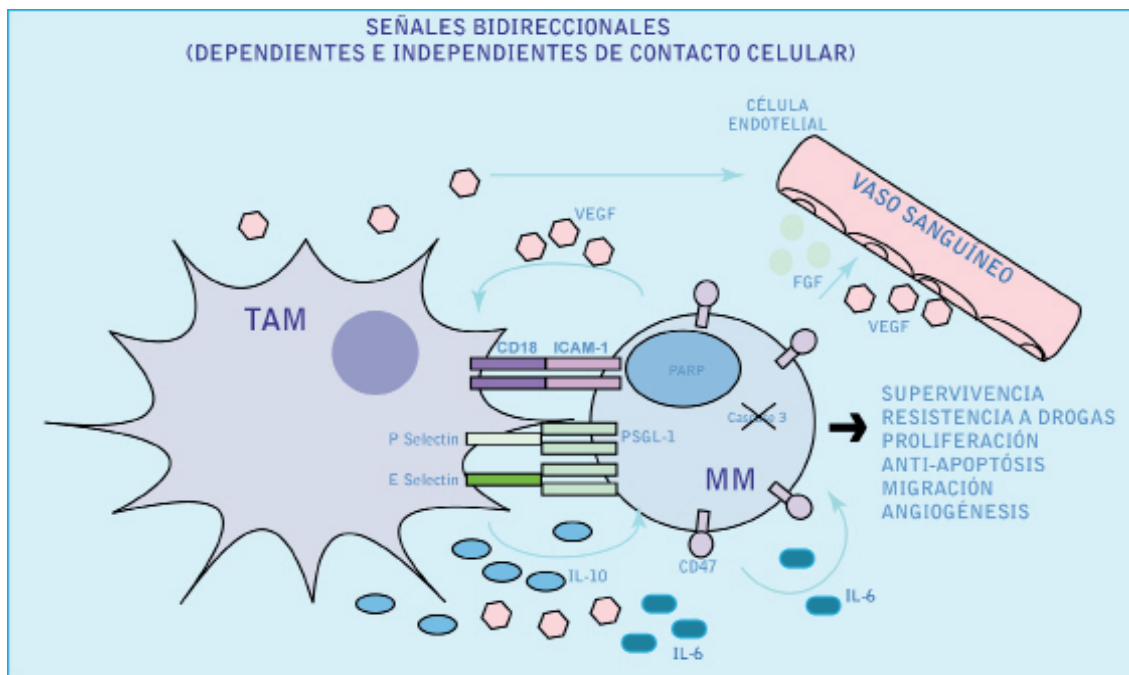


Figura 2. Interacciones reguladoras existentes entre las células de MM y los TAMs en el microambiente medular. Los MØ presentes en la MO mandan señales de supervivencia a las células tumorales de MM mediante interacciones de contacto celular directo (PSGL-1/selectinas y CD18/ICAM-1) y la secreción de citoquinas (IL-6), o indirectamente a través de la secreción de mediadores pro-angiogénicos (VEGF). A nivel metabólico, la interacción del MM con los MØ induce en la célula tumoral la activación de la vía de Erk1/2 y Bcl-xL, así como la inhibición de la caspasa-3 y como consecuencia, PARP permanece activa. A su vez, las células de MM secretan citoquinas y factores que contribuyen de manera autocrina en su propia supervivencia y proliferación, y de manera paracrina en la estimulación y mantenimiento de un microambiente pro-tumoral, inmunosupresivo y pro-angiogénico (VEGF, FGF), inductor de la progresión tumoral.

TAM como diana terapéutica

Se han utilizado varias aproximaciones en las cuales se explota a los MØ como posible diana terapéutica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el bloqueo de moléculas clave que regulan el reclutamiento de los monocitos/MØ a las zonas tumorales

o la disminución de su viabilidad mediante bajas dosis de quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, el verdadero reto clínico reside en explotar la potencial naturaleza anti-tumoral del TAM, mediante el desarrollo de estrategias terapéuticas que nos permitan por un lado bloquear las funciones pro-tumorales de los TAMs y que a su vez promuevan las funciones anti-tumorales del MØ. En este trabajo nos vamos a centrar en el estudio de la inhibición de dos moléculas, M-CSF y en mayor medida MIF (Factor inhibidor de la migración de MØ), para repolarización del MØ hacia un fenotipo anti-tumoral.

Factor estimulador de colonias (M-CSF)

37

Hasta la fecha son pocas las moléculas que han sido identificadas capaces de orquestar el proceso de re-educación desde un MØ pro-tumoral hacia un MØ anti-tumoral y que puedan ser utilizadas como dianas terapéuticas. La mayor estrategia desarrollada hasta hoy con este objetivo ha sido la inhibición de la molécula M-CSF o también llamada factor estimulador de colonias (CSF-1), mediante anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la neutralización de esta citoquina, hacia el bloqueo de la fracción extracelular (M279 o AFS98) o intracelular de su receptor CSF-1r bloqueando farmacológicamente la actividad tirosin-quinasa, esto último mediante el uso de inhibidores de bajo peso molecular (KI20227 o GW2580) (Laoui et al., 2014). M-CSF junto con GM-CSF, son citoquinas muy importantes implicadas en el control de la diferenciación, proliferación y regulación funcional de los monocitos y MØ. M-CSF es muy importante para el desarrollo, el establecimiento y mantenimiento de la población de MØ residentes en los tejidos y su señalización a través de su receptor es muy importante en la polarización de los MØ. Se produce de manera ubicua en el organismo controlando la población de MØ en los tejidos, mientras que la producción de GM-CSF se eleva generalmente en procesos inflamatorios (Lacey et al., 2012). La diferenciación de los MØ en presencia de M-CSF conduce a la expresión de genes pertenecientes al transcriptoma M2, mientras que GM-CSF conduciría a un tipo de activación pro-inflamatoria (Martinez et al., 2006; Sierra-Filardi et al., 2011).

Cada vez son más los estudios que relacionan altos niveles de expresión de M-CSF en el tumor con un mayor número de TAMs y esto a su vez se correlaciona con progresión

tumoral y, en determinados casos, con mayor metástasis, incluyendo el cáncer de mama, cáncer de endometrio o cáncer de riñón (Espinosa et al., 2009; Espinosa et al., 2014; Scholl et al., 1994). En este aspecto, la citoquina M-CSF contribuye al reclutamiento del MØ a la zona tumoral promoviendo la migración y supervivencia (Mantovani et al., 2002). Estudios realizados en ratones con una mutación en M-CSF *csf1op/op*, lo que resulta en la expresión no funcional de la citoquina, han proporcionado fuertes aportaciones al concepto de la función pro-tumoral del sistema mononuclear fagocítico (Lin et al., 2001; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990). El papel crítico de esta citoquina en el tumor de estos ratones deficientes *csf1op/op* se vio reflejado en la drástica disminución en el reclutamiento del MØ al tumor así como un aumento del crecimiento tumoral y en la formación de estroma (Pyonteck et al., 2012). En un modelo de ratón de glioblastoma la inhibición de CSF-1r no produjo cambios en el número de MØ reclutados pero sí originó un cambio en la polarización de los TAMs hacia un fenotipo anti-tumoral, con una reducción en los marcadores de tipo M2, que resultó en una reducción muy importante del tamaño del tumor y un aumento en la supervivencia del ratón (Pyonteck et al., 2013). En este contexto, numerosos estudios en modelos tumorales preclínicos han revelado como el bloqueo de la señalización del receptor CSF-1r reduce en la mayoría de los casos la cantidad de TAMs en el tumor y como esto tiene el potencial de atenuar los efectos pro-tumorales de estas células en la angiogénesis, invasión y metástasis de las células tumorales. Algunas de estas moléculas inhibidoras de M-CSF se encuentran actualmente en ensayos clínicos, como el anticuerpo humanizado bloqueante de CSF-1r llamado IMC-CS4 o el inhibidor PLX3397, aunque se ha visto que este último presenta también especificidad por otros dominios intracelulares (Butowski et al., 2016).

A pesar de la multitud de estudios que se han realizado en este sentido muy pocos son los ensayos que han abordado el efecto de la inhibición de M-CSF o de su receptor en el estado de polarización de los TAM (Laoui et al., 2014) y ninguna de estas estrategias han sido probadas todavía en el tratamiento del MM. En este trabajo se ha utilizado un anticuerpo neutralizante de la molécula M-CSF y moléculas de bajo peso molecular inhibidoras del dominio tirosin-kinasa de su receptor, GW2580 y KI20227 con el objetivo de re-educar al MØ desde un fenotipo pro-tumoral M2 hacia un fenotipo anti-tumoral (Conway et al., 2005;

Ohno et al., 2006).

Factor inhibidor de la migración de MØ (MIF)

El factor inhibidor de la migración de MØ (MIF) se descubrió hace 40 años (1966) como una de las primeras moléculas identificadas como citoquina, aunque con numerosas propiedades poco comunes que la caracterizan y la diferencian del resto (Bloom and Bennett, 1966; Lue et al., 2002). Es una proteína multifuncional con una amplia participación en numerosos procesos biológicos y a pesar de ser una de las primeras citoquinas descritas, es posiblemente una de las menos comprendidas. Fue inicialmente descrita como un citoquina aislada de los sobrenadantes de los linfocitos T que inhibía la migración aleatoria de los MØ (Bloom and Bennett, 1966; David, 1966). Sin embargo, las funciones biológicas de MIF no se pudieron estudiar en profundidad hasta que se clonó su ADN complementario tres décadas después (Weiser et al., 1989). Años más tarde de su clonación, estudios cristalográficos de la estructura de MIF indicaron que se trata de un trímero formado por subunidades idénticas (homotrímero), y que cada monómero está formado por una estructura en “beta-sheet” formada por hélices-alfa antiparalelas, una estructura muy singular comparada con el resto de citoquinas (**Figura 3**) (Sun et al., 1996; Suzuki et al., 1996). El único miembro de su familia que se ha identificado es la D-dopacromo tautomerasa (D-DT), aunque únicamente comparten una homología del 34% de su secuencia. MIF ha sido denominado como una “citoquina con actividad enzimática”, con una homología estructural similar a enzimas bacterianas, catalizando la tautomerización del sustrato no fisiológico D-dopacromo en sus derivado indol (Merk et al., 2012). Esta actividad reside en un residuo de prolina en el N-terminal de la molécula y hoy en día se considera una función vestigial de este factor cuya relevancia fisiológica todavía no se ha descubierto (Kleemann et al., 1999; Rosengren et al., 1996). Esta actividad de MIF se descubrió al analizar el proceso de tautomerización del sustrato natural L-dopacromo en el proceso de melanogénesis (Odh et al., 1993). Además, se ha visto que tiene actividad oxidorreductasa, responsable de determinadas funciones biológicas descritas, ya que contiene un dominio CXXC en el centro de la secuencia muy conservado en proteínas antioxidantes (Kudrin and Ray, 2008). Una vez expresado, MIF se almacena en depósitos

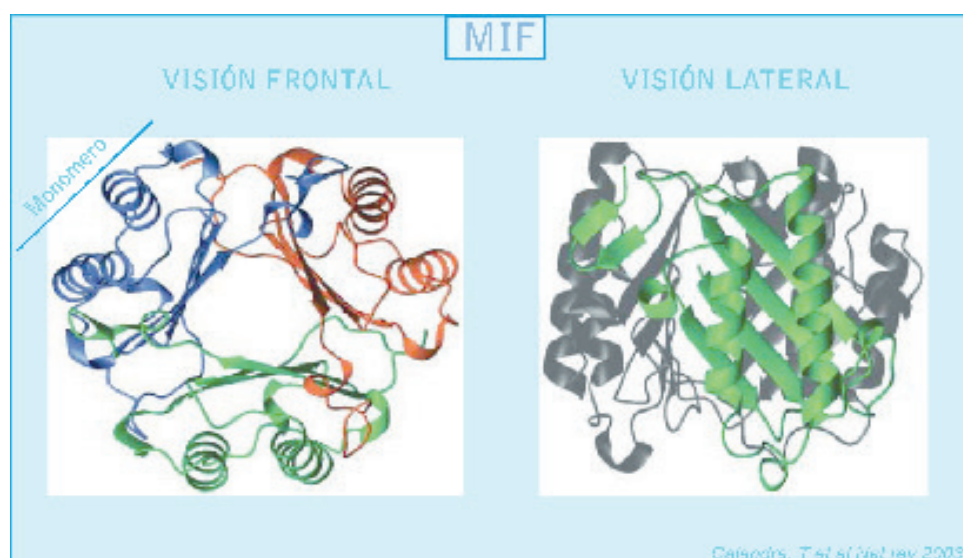


Figura 3. Estructura tridimensional de MIF. En el panel de la izquierda se representa la visión frontal de la estructura 3D del factor MIF, formado por tres monómeros (indicado en la figura). En el panel de la derecha se muestra la visión lateral de la molécula.

en el interior de la célula, no siendo necesaria una síntesis “de novo” para su secreción (Calandra and Roger, 2003).

Aunque en un principio se pensó que las células T eran la principal fuente de MIF, más tarde se vio que se expresaba de manera constitutiva en el resto de células del sistema inmune, siendo los MØ una de sus fuentes productoras más importantes (Calandra et al., 1994). Pero también se detectó en numerosas células no inmunes, con una distribución en el organismo prácticamente ubicua que ejerce sus efectos a nivel autocrino y paracrino (Calandra et al., 1994).

Desde su descubrimiento, la mayoría de los trabajos descritos acerca de la actividad funcional de MIF son estudios realizados a finales de la década de los 90 y siempre desarrollados en un contexto inflamatorio. En este sentido, se ha relacionado a MIF con un papel importante en la regulación de la respuesta sistémica del organismo frente a infecciones (Bernhagen et al., 1993; Bozza et al., 1999). Se ha visto que se expresa abundantemente en el sistema endocrino donde es secretado por las células de la pituitaria anterior de forma similar a una hormona en respuesta a LPS, potenciando los efectos letales de la endotoxemia (Bernhagen et al., 1993). En este contexto, también se ha visto que MIF tiene un efecto inhibitor sobre

los glucocorticoides liberados en la respuesta de estrés del organismo y que participa en la regulación de la glucosa durante el estrés metabólico producido tras una infección (Benigni et al., 2000; Calandra et al., 1995). La región responsable de MIF en la anulación del efecto producido por los glucocorticoides parece residir en el dominio CXXC con actividad oxidorreductasa (Nguyen et al., 2003). En cuanto a las bases moleculares de su participación en la respuesta inmune innata frente a endotoxinas se ha descrito que MIF regula el receptor TLR-4. Una ausencia de MIF provocaría una disminución en la expresión de TLR-4, lo que se ha relacionado con la reducción en los niveles del factor de transcripción PU.1, necesario para una correcta expresión del receptor (Roger et al., 2001). Aunque PU.1 parece intervenir a nivel global en el panorama regulatorio del genoma de los MØ, regulando todo el repertorio transcripcional de estas células (Lawrence and Natoli, 2011).

41

MIF produce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-6, IL-8 e IL-12) contribuyendo al estado patológico de diversas enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios como la artritis o el lupus eritematoso, donde los niveles de esta citoquina se encuentran incrementados. Sin embargo, desde principios del año 2000 se ha visto que en contextos relacionados con carcinogénesis MIF desempeña funciones de carácter anti-inflamatorio, con un papel muy importante en el desarrollo y progresión de numerosos tipos de cáncer (Meyer-Siegler et al., 1996; Verjans et al., 2009). En este contexto, se ha descrito como MIF ejerce un efecto directo sobre las células del sistema inmune, modificando su respuesta en procesos cancerígenos.

Uno de los papeles críticos de este factor parece ser el control de la activación alternativa de los MØ, descrito en modelos de melanoma en ratón, lo que contribuye a la adquisición de un fenotipo TAM por parte de estas células, favoreciendo la progresión tumoral (Yaddanapudi et al., 2013). También se ha descrito como MIF debilita la respuesta anti-tumoral mediante una inmunosupresión causada sobre las células T y las células NK en modelos de ratón, acción que favorece la viabilidad y la progresión tumoral y que se revierte mediante la inhibición sistémica de esta molécula (Abe et al., 2001; Zhou et al., 2008). MIF se encuentra sobre-expresado en modelos murinos de cáncer de ovario favoreciendo la inhibición de la actividad anti-tumoral de las células T CD8⁺ y NK mediante la reducción en la expresión de NKG2D,

receptor necesario para la coestimulación y activación de estas células, respectivamente (Krockenberger et al., 2008).

Pero MIF también ejerce un efecto directo sobre las propias células tumorales. Se expresa de manera abundante en muchos tipos de cáncer, estimulando su crecimiento como en el caso de la leucemia linfocítica crónica (LLC), el cáncer de pulmón de células pequeñas (NSCLC), el cáncer colorrectal, el cáncer de mama o el cáncer de próstata, en este último se ha propuesto como biomarcador (Brock et al., 2012; Meyer-Siegler et al., 2002; Reinart et al., 2013; Xia et al., 2009).

42

Se ha visto que uno de los procesos por los que MIF contribuye al crecimiento tumoral es mediante la inhibición de la apoptosis celular al suprimir p53, conocida como la proteína supresora de tumores ya que se encarga del control del ciclo celular (Fingerle-Rowson et al., 2003; Hudson et al., 1999). Además, existen estudios que relacionan a MIF con la propia progresión del ciclo celular tanto de células normales como de células transformadas (Liao et al., 2003).

También se ha relacionado a MIF con los procesos de neovascularización asociada a tumores en diversos tipos de cáncer como linfomas, NSCLC, melanoma o carcinoma de colon. En glioblastoma se han correlacionado altos niveles de expresión de MIF con un aumento en VEGF y con neovascularización (Mitchell, 2004; White et al., 2003).

Debido a la alta implicación de MIF en numerosos procesos biológicos relacionados con el desarrollo de estados patológicos de carácter neoplásico e inflamatorio, ésta molécula se considera una diana terapéutica muy atractiva sobre la que se han identificado multitud de moléculas inhibidoras de su actividad que pueden ser usadas como tratamiento de estas enfermedades. En este trabajo hemos utilizado dos moléculas de diferente naturaleza inhibidora para el bloqueo de MIF en el contexto de la enfermedad del MM, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*, la primera de ellas es el inhibidor suicida 4-IPP (4-yodo-6-fenil pirimidina) que se une covalentemente a MIF en el nitrógeno de la prolina del N-terminal mediante la sustitución de un grupo yodo por un grupo fenilo en el bolsillo catalítico de la actividad tautomerasa (**Figura 4**) (Winner et al., 2008). El otro compuesto es un inhibidor alostérico denominado “Chicago Sky blue” o p425, caracterizado por una unión a través de puentes de

hidrógeno que bloquea su actividad tautomerasa (Bai et al., 2012).

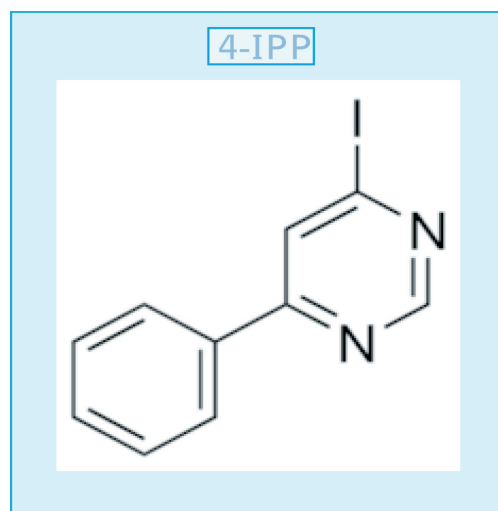


Figura 4. Estructura química del 4-yodo-fenilpirimidina (4-IPP).

Mecanismo de acción de MIF

El mecanismo de señalización de MIF no se conoció hasta 35 años después de su descubrimiento, cuando se identificó a CD74 como molécula de unión de alta afinidad a MIF (Leng et al., 2003). CD74 se expresa en monocitos/macrófagos, células B, células mesenquimales, epiteliales y endoteliales. En las células presentadoras de antígenos, CD74 actúa como cadena invariante del receptor MHC de clase II y sirve como transportador de las proteínas de clase II desde el RE hasta el endosoma. Pero CD74 también puede existir en la superficie de la célula gracias a la adición de un grupo condroitín sulfato por donde puede unirse a la molécula con actividad tirosina quinasa CD44, formando un complejo necesario para que se produzca la transducción de la señal de MIF en determinados tipos celulares (Sant et al., 1985; Shi et al., 2006). La unión de MIF al complejo CD74/CD44 inicia la transducción de la señal mediante la fosforilación de la vía de señalización ERK1-ERK2-MAPK (Shi et al., 2006)

Posteriormente, se ha visto que MIF promueve el reclutamiento de los monocitos y de células T en aterosclerosis actuando a través de los receptores de quimioquinas CXCR2 y CXCR4 respectivamente, donde CXCR2 se encuentra interaccionando con CD74 formando

complejos CXCR4/CD74 ([Bernhagen et al., 2007](#)). También se vio que promovía la migración de las células B a través del complejo CXCR4/CD74 y más tarde se identificó a CXCR7 en este fenómeno ([Alampour-Rajabi et al., 2015](#); [Klasen et al., 2014](#)). Parece ser que dependiendo del contexto, MIF podría señalar a través de uno o de varios de sus receptores formando un complejo.

Entre sus funciones a nivel intracelular se ha descrito que MIF interacciona con la proteína Jab1 regulando negativamente las vías controladas por esta última ([Kleeman et al., 2000](#)) .

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN

El mieloma múltiple (MM) es la segunda neoplasia hematológica más frecuente, suponiendo un 15-20% de todas las muertes provocadas por cánceres de este tipo. A pesar de los avances que se han realizado en las últimas décadas respecto a la incorporación de nuevos agentes inmunomoduladores en su tratamiento, el MM permanece incurable, debido principalmente a la fuerte interacción que mantienen las células tumorales con el microambiente de la médula ósea, integrado por numerosos tipos celulares, donde los macrófagos representan un componente crítico en el aporte de supervivencia y resistencia a drogas, promoviendo la progresión tumoral. Por esta razón, se necesita de manera urgente el desarrollo de nuevos fármacos y/o estrategias dirigidos no sólo hacia el tratamiento de las células tumorales, sino también hacia las células que forman parte del microambiente medular, como los macrófagos, y que permiten la recaída de la enfermedad.

49

HIPÓTESIS

Modificación del microambiente tumoral como posible terapia en el MM mediante tratamientos dirigidos hacia el macrófago asociado a tumor (TAM) con el fin de lograr un cambio en sus funciones pro-tumorales.

OBJETIVOS

-
1. Estudio del comportamiento de diferentes estados de polarización de macrófagos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios con respecto a las células tumorales de MM.
 2. Análisis fenotípico de la población de TAMs asociados a MM en muestras de pacientes.
 3. Diseño de estrategias destinadas al tratamiento del MM a través de la modificación fenotípica y funcional de los TAMs.
 4. Estudio del efecto terapéutico de los tratamientos diseñados en modelos de ratón xenotransplantados con células de MM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de paciente, diferenciación de MØ y líneas celulares

Las muestras de pacientes de MM se obtuvieron bajo el consentimiento informado y siguiendo las directrices de los Comités Éticos del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital 12 de Octubre (tabla 2) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON MM						
MUESTRA	GÉNERO	EDAD (AÑOS)	ISOTIPO DE MM	ESTADIO	% CP MO	TERAPIA RECIBIDA
1	M	81	BJ Lambda	MM ISS: I	58%	Elo+Dexa+Lena
2	M	54	IgA Lambda	MM ISS: I	34%	NO
3	M	85	IgG Lambda	MM ISS: I	40%	NO
4	M	85	IgG kappa	MM ISS: III	84%	NO
5	M	59	BJ Kappa	MM ISS: I	20%	1º VCD 2º Lena+Dexa
6	F	59	IgA Kappa	MM ISS: II	76%	NO
7	F	79	BJ Lambda	MM ISS: III	75%	NO
8	M	82	IgA Lambda	MM ISS: III	71%	NO
9	M	86	IgG Lambda	MM ISS: I	38%	NO
10	F	54	IgG Lambda	MM	5%	NO

Tabla 2. Características de los pacientes con MM incluidos en el estudio. (Elo: Elotuzumab, Dexa: Dexametasone; Lena: lenalidomide; VCD: velcade + ciclofosfamida + dexametasone)

1.1 Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de macrófagos.

Los monocitos humanos de sangre periférica se aislaron a partir de concentrados leucocitarios (Buffy coats) de donantes sanos obtenidos del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. Las células mononucleares (PBMCs) se separaron por centrifugación en un gradiente de densidad creado por Ficoll (Lymphoprep).

El aislamiento de los monocitos se realizó mediante selección positiva con anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolas magnéticas (CD14 Microbeads human, Miltenyi Biotec). La pureza y viabilidad se analizó mediante citometría de flujo.

Los monocitos se cultivaron a una concentración de 0.5×10^6 células/ml en placas de 12 pocillos (Costar) durante 7 días en medio RPMI 1640 (Gibco Life Technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Sigma Aldrich) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. La diferenciación de monocito a macrófago se realizó en presencia de GM-CSF (1000 U/ml, Immunotools) o en presencia de M-CSF (10 ng/ml, ImmunoTools) que generan macrófagos MØ-GM con fenotipo M1 pro-inflamatorio o MØ-M con fenotipo M2 anti-inflamatorio/protumoral, respectivamente. Las citoquinas se añadieron cada dos días. Los MØ-GM y MØ-M se estimularon adicionalmente con una dosis de LPS (10 ng/ml) e interferón gamma (IFN- γ) (500 U/ml) o IL-4, respectivamente, y se generaron MØ-LPS/IFN y MØ-IL4 (ver esquema de diferenciación Resultados Figura 5A y 12A).

1.2 Aislamiento de monocitos murinos y diferenciación de macrófagos.

Se aislaron las células de MO de fémures extraídos de ratones NSG y se cultivaron en placas de 12 pocillos (costar) durante 48 horas en medio DMEM (10% SBF + β -mercaptoetanol). Pasado ese tiempo, se recogieron las células en suspensión y se trasladaron a una placa nueva de 12 pocillos donde se cultivaron en presencia de las citoquinas GM-CSF o M-CSF para generar macrófagos MØ-GM o MØ-M, respectivamente.

1.3 Aislamiento de células primarias de pacientes con MM.

Las células primarias de MM se aislaron a partir de aspirados de médula ósea de pacientes proporcionados por el Departamento de Hematología del Hospital General Gregorio Marañón. La purificación se realizó mediante la incubación de las células con bolas magnéticas acopladas al anticuerpo CD138 y seguidamente se separaron por selección positiva en columna magnética (Microbeads CD138, Miltenyi Biotec). Las células purificadas se cultivaron en RPMI al 10% de SBF (37°C, 5% CO₂ y 95 % de humedad).

59

1.4 Líneas celulares.

En este trabajo se han utilizado las líneas celulares humanas de MM NCI-H929, U266, MM.1S y MM.1S-GFP. Mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 0.05 mM de beta-mercaptoetanol en el caso de la línea NCI-H929. Se cultivaron a 37° C, 5% CO₂ y una atmósfera del 95% de humedad.

2. Protocolo de repolarización *in vitro*

Una vez obtenidos los MØ-M diferenciados se reemplazó su sobrenadante con medio fresco RPMI 10% SBF y consecutivamente se añadieron tres dosis de repolarización con los diferentes agentes (ver **Tabla 3**) cada dos días durante siete días adicionales (ver esquema

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA REPOLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS		
REACTIVOS	FUNCIÓN	CASA COMERCIAL
GM-CSF	Estímulo pro-M1	Tocris, MO, USA
4-IPP	Inhibidor de MIF	Tocris, MO, USA
Anti-MCSF	Anticuerpo bloqueante de M-CSF	R&D Systems
Chicago Sky Blue (CSB)	Inhibidor de MIF	Tocris, MO, USA
GW2580	Inhibidor de CSF-1r	Abcam, Cambridge, UK
KI20227	Inhibidor de CSF-1r	Tocris, MO, USA

Tabla 3. Reactivos usados en el proceso de repolarización de los MØ-M.

3. Co-cultivos y cultivos con medios condicionados

3.1 Co-cultivos directos (contacto célula-célula).

Para la realización de co-cultivos directos las células de MM se añadieron sobre los MØ-GM, MØ-M, o los MØ-repolarizados (ratio MØ-MM 1:1). Se mantuvieron en cultivo durante 72 horas a 37°C para posteriormente llevar a cabo los análisis de muerte celular y/o de proliferación.

3.2 Co-cultivos en transwell (ausencia de contacto célula-célula).

Para co-cultivos en los que no se requería contacto célula-célula, se utilizaron transwells de 0,4 µM (Corning, Costar Corp., NY), con un tamaño de poro que permite el intercambio de sustancias pero no el paso libre de las células de un compartimento al otro. Los MØ se diferenciaron en los pocillos inferiores de la placa de transwell y las células de MM se añadieron sobre las cámaras superiores (ratio MØ-MM 1:1). Se mantuvieron en cultivo durante 72 horas a 37°C para posteriormente analizar la muerte celular del MM.

3.3 Cultivos con medios condicionados.

Las células de MM se cultivaron durante 72 horas en presencia de medios condicionados de MØ-GM, MØ-M, MØ-LPS/IFN o MØ-IL-4 y posteriormente se analizó la muerte celular en las células de MM.

4. Análisis de muerte celular

La fracción de células muertas de MM se analizó por citometría de flujo mediante la tinción con AnexinaV conjugada a FITC y yoduro de propidio (AnxV/YP), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, en los casos de co-cultivo celular directo se llevó a cabo la tinción con el anticuerpo CD14 acoplado a APC, con el fin de poder excluir la población contaminante de MØ del análisis (ver Resultados Figura 6A).

5. Ensayos de proliferación celular

Para analizar la proliferación de las células de MM en presencia de los MØ-GM o MØ-M se utilizó el marcaje con Carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE). Este reactivo una vez que entra en la célula pierde los grupos acetatos por acción de las esterasas celulares volviéndose impermeable, de manera que la pérdida de fluorescencia es indicativa de división celular ya que la tinción con CFSE se reparte entre las células hijas. De este modo la línea NCI-H929 se marcó con CFSE a una concentración de $10\mu\text{M}/10 \times 10^6$ células durante 10 minutos a 37°C en PBS. Pasado el tiempo de incubación la reacción se bloqueó mediante tres lavados de medio con suero 10% SBF, con el fin de retirar todo el CFSE no incorporado. Las células marcadas se añadieron sobre los MØ-GM o MØ-M y la proliferación de las células de MM se analizó mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, FACSort). Con el fin de poder excluir tanto la población contaminante de MØ como la población de células muertas del análisis también se llevó a cabo la tinción con CD14-PerCP y con 7-ADD, respectivamente.

61

6. Ensayos de inhibición de citotoxicidad

Los diferentes reactivos inhibidores o bloqueantes de moléculas solubles implicadas en la citotoxicidad ejercida por los MØ-GM se añadieron directamente a co-cultivos directos MØ-GM+MM, o a las células de MM cultivadas únicamente en presencia de los medios condicionados de los MØ-GM. Los reactivos utilizados se muestran en la **Tabla 4**.

REACTIVOS INHIBIDORES DE CITOTOXICIDAD		
INHIBIDOR / CONCENTRACIÓN	FUNCIÓN	PROCEDENCIA
Infliximab (50µg/ml)	Anticuerpo bloqueante de TNF-α	Cedido por H. Gregorio Marañón
BHA (100µM)	Inhibidor de ROS/NOS	Sigma Aldrich
kp 7-6 (500µg/ml)	Inhibidor de Fas-FasL	Cedido por H. Gregorio Marañón
Cóctel de inhibidores de proteasas (1:200)	Inhibidores de proteasas extracelulares	Sigma Aldrich
Anti-activina (5µg/ml)	Anticuerpo bloqueante	Cedido por la Dr. Puig (H. Gregorio Maraño, Madrid, Spain)

62

Tabla 4. Reactivos inhibidores o bloqueantes de moléculas implicadas en citotoxicidad.

7. Análisis de marcadores por citometría de flujo

Se realizaron análisis por citometría de flujo de diferentes marcadores, superficiales e intracelulares, que se muestran en la **Tabla 5**. La detección de las moléculas se realizó por inmunofluorescencia directa, mediante el uso de anticuerpos acoplados directamente a un fluorocromo (FITC, PrCP o APC), e indirecta, mediante el uso de un anticuerpo primario dirigido hacia la molécula de interés unido a un anticuerpo secundario (anti-mouse) acoplado a FITC. En ambos casos, la incubación con los anticuerpos se realizó en presencia de inmunoglobulinas humanas IgG (50 µg/ml), con el fin de bloquear los receptores Fc presentes en la superficie de los MØ y así prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos de interés. Para los marcajes intracelulares, previamente a la incubación con los anticuerpos, las células se fijaron en formaldehído al 3,7% (10 minutos, temperatura ambiente) y posteriormente se permeabilizaron con tritón al 0,1% (5 minutos, temperatura ambiente). Como controles negativos se utilizaron controles de isotipo específico acoplados al fluorocromo utilizado en cada caso y para los marcajes indirectos, se utilizó el anticuerpo P3X63 que se une a antígenos no expresados por la célula (cedido por el Dr. Francisco Sánchez Madrid, HULP).

ANTICUERPOS ANALIZADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO		
ANTICUERPO	ESPECIE	PROCEDENCIA
Anti-Receptor de folato β	Ratón	Cedido por la Dr. Puig (H. Gregorio Marañón, Madrid, Spain)
Anti-CD14-APC	Ratón	BD Biosciences, CA, USA
Anti-CD14-PerCP	Ratón	BD Biosciences, CA, USA
Anti-CD163 FITC	Ratón	BD Biosciences, CA, USA
Anti-ICAM-3-FITC	Ratón	BD Biosciences, CA, USA
Anti-CXCR7	Ratón	Cedido por Dr. Sánchez Madrid (Hospital de la Princesa)
Anti-CXCR2	Ratón	Cedido por Dr. Sánchez Madrid (Hospital de la Princesa)
Anti-CD74	Ratón	Biolegend

63

Tabla 5. Anticuerpos secundarios usados en citometría de flujo.

8. Western blot

Los extractos celulares completos se lisaron en “buffer” RIPA (50mM TRIS-HCl PH 7,5; 150mM NaCl; 0,5% Deoxicolato de sodio; 0,05% SDS; 1% NP-40; Inhibidores de proteasas; 1M NAF y 100mM Na₃VO₄). La cantidad de proteína se cuantificó mediante un “kit” comercial basado en un método colorimétrico (BioRad) y cantidades iguales de proteína (10-30ug), previamente desnaturalizadas a 95°C en tampón laemmli, se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS) (BioRad). Las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilo (PVDF, Pall Corporation) y posteriormente se bloquearon durante 1 hora en leche al 5% en buffer salino TRIS (TBS) 0,1 % Tween-20. A continuación se incubaron las membranas con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Se lavaron las membranas con TBS-Tween 3X y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HPR). Las proteínas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (thermo Scientific) y se muestran

en la **Tabla 6 y 7**. El análisis de densitometría se realizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health,USA). Las unidades expresadas son arbitrarias.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE/CLON	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
P-AMPK	Conejo / Thr172	Cell Signalling Technologies / 2531
GAPDH	Ratón / 6c5	Santa Cruz Biotechnologies / sc-32233

Tabla 6. Anticuerpos primarios usados en “western blot”.

64

ANTICUERPOS SECUNDARIOS	ESPECIE/CLON	CASA COMERCIAL/REFERENCIA
Inmunoglobulinas Anti- conejo (Peroxidasa)	Conejo / Policlonal	Dako / P0260
Inmunoglobulinas Anti-ratón (Peroxidasa)	Conejo / RG-16	Sigma Aldrich / A2074

Tabla 7. Anticuerpos secundarios usados en “western blot”.

9. ELISA

Los medios condicionados de las células de MM, de los MØ y provenientes de co-cultivos de 72 horas MØ+MM se recogieron, se centrifugaron a máxima velocidad y los niveles de TNF α se midieron cuantitativamente mediante un ELISA comercial (Elisa Max deluxe, Biolegend), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para medir los niveles de la citoquina MIF se realizó el mismo procedimiento utilizándose el ELISA comercial (Ray Biotech).

10. Inmunofluorescencia

10.1 Muestras medulares

Las muestras medulares de pacientes con MM analizadas en este trabajo se obtuvieron siguiendo los procedimientos médico-éticos establecidos (Hospital 12 de Octubre). Los aspirados de MO, obtenidos mediante punción de la cresta ilíaca o del esternón, contienen partículas denominadas “grumos”, estructuras medulares que preservan la arquitectura de la MO y que al expandirse en cristales se puede proceder a su estudio histológico. Puesto que los grumos confieren cierto grado de profundidad al tejido el protocolo seguido para el marcaje por inmunofluorescencia en estas muestras ha sido el “whole mount”, donde los tiempos tanto de incubación como de lavado son más largos de lo habitual. La tinción se llevó a cabo en cámara húmeda.

Para prevenir la unión inespecífica de los fragmentos Fc las muestras se bloquearon previamente con inmunoglobulinas humanas 5µg/ml (1 hora) y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (1-5µg/ml) durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron tres lavados (1,5 h) y se procedió con la incubación de los anticuerpos secundarios (16 horas; temperatura ambiente) seguida de tres lavados más (1,5 horas). Por último se añadió DAPI (CalbioChem) para colorear los núcleos celulares (3 horas) y se procedió al montaje de las muestras en medio de montaje para fluorescencia (Dako Cytomation). Los anticuerpos primarios y secundarios se muestran en la **Tabla 8**.

Los grumos medulares se analizaron con un microscopio confocal de fluorescencia (SP2, Leica-Microsystems). Se usó el objetivo 10x PL-APO NA 0.4 y el objetivo de inmersión 20x PL-APO NA 0.7 para la realización de barridos del tejido y la cuantificación de la imagen, respectivamente. Las regiones de interés (ROIs) acordes con las células TAM CD163+ se segmentaron utilizando el software FIJI (Instituto Nacional de Salud, EE.UU.), y se evaluó la intensidad media de fluorescencia de los marcadores que presentaban co-tinción para cada MØ. Datos de 400-600 TAMs de 4-5 pacientes se muestran para cada marcador analizado (GraphPad Prism5).

ANTICUERPOS PRIMARIOS USADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA DE MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA		
ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE / CLON	CASA COMERCIAL / REFERENCIA
CD163	Ratón IgG1/ Ber-Mac3	MBL / K0147-3
DC-SIGN	Ratón IgG2b/ DCN46	Becton Dickinson / 551249
PHD3	Conejo / Policlonal	Abcam/ ab30782
TNF α	Conejo / Policlonal	Abcam / Ab6671
MIF	Cabra / Policlonal	R&D Systems/ AF-289-PB
CD74	Ratón IgG1 / LN2	Biolegend/326802
Clec5A	Conejo / Thr172	Cedido por Dra. Carmen Sánchez (CINVESTAV, México)
Folate Receptor	Sobrenadante de ratón /	Cedido por la Dra. Amaya Puig

Tabla 8. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia de tejido.

10.2 Tumores de xenotransplante de MM

Los tumores, una vez extraídos, se cortaron para obtener tamaños de aproximadamente 5X5 mm y se congelaron en OCT (Compound Tissue-Tek, Sakura) a -80°C. Los tejidos se cortaron en el criostato en secciones de 4 μ m y se fijaron con acetona (99.5%, Pancreac) a -20°C. Los tejidos se bloquearon con inmunoglobulinas de ratón (15 minutos) y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (1 hora) (**Tabla 9**). Después de tres lavados (10 minutos) se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo (45 minutos) y posteriormente se realizaron tres lavados más de la misma duración. El marcaje de los núcleos celulares se realizó con DAPI (10 minutos).

ANTICUERPOS PRIMARIOS USADOS EN INMUNOFLUORESCENCIA DE TUMORES		
ANTICUERPOS PRIMARIOS	ESPECIE / CLON	CASA COMERCIAL / REFERENCIA
CD163	Ratón IgG1/ Ber-Mac3	MBL / K0147-3
F4/80	Rata / BM8	Biolegend / 123122
Ki67 (H300)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
Caspasa 3 activada	Conejo	Becton Dickinson
Cd45	Cabra / Policlonal	R&D Systems/ AF-289-PB
CD38	Ratón IgG1 / MI15	Becton Dickinson / 566061
CD138	Ratón IgG1 / AT1 3/5	Dako / F7101

67

Tabla 9. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia de tejido tumoral.

11. Modelos murinos de xenotransplante de MM

11.1 Modelo sistémico

Las células de la línea MM.1S-GFP (5×10^6) se inyectaron intravenosamente en ratones NSG. Después de 10 días, se administró intraperitonealmente cada dos días GM-CSF (3000 U/kg; disuelto en PBS) y 4-IPP (80 mg/kg; disuelto en aceite de maíz), o el vehículo (PBS y DMSO en aceite de maíz). Después de dos semanas los ratones se sacrificaron, se aislaron las células de la MO de los fémures de los ratones y se analizó la infiltración de células de MM en la MO mediante la expresión de HLA-1 humano y GFP por citometría de flujo, y mediante PCR cuantitativa la expresión de GAPDH humana.

11.2 Modelo subcutáneo

Las células de la línea de MM NCI-H929 (3×10^6 células) se inyectaron subcutáneamente (s.c) en ratones inmunodeficientes SCID o altamente inmunodeficientes NSG (NOD/SCID/IL-2Rgamma^{-/-}). Una vez los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100 mm^3 , los ratones se trataron cada dos días intraperitonealmente con GM-CSF disuelto en PBS (3000 U/kg, Peprotech) y 4-IPP disuelto en aceite de maíz (80 mg/kg, Tocris). Por otro lado, los ratones control se trataron con los vehículos PBS y aceite de maíz. El crecimiento tumoral se

monitorizó a diario midiendo las dimensiones del tumor con un calibre. Una vez los ratones se sacrificaron, el tejido tumoral se destinó para la purificación de la población mieloide Cd11b⁺ (Microbeads Cd11b, Miltenyi) y posterior extracción de su ARN para RT-PCR cuantitativa.

En modelos alternativos, las células de la línea de MM NCI-H929 (3x10⁶ células) se co-inyectaron s.c en conjunto con MØ-GM o MØ-M en ratones NSG (ratio MM/MØ 1:1), o los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron 100mm³ y se inyectaron los MØ intratumoralmente (i.t). Después de 10 días los ratones se sacrificaron y se procedió al análisis del volumen tumoral y a su evaluación mediante microscopía confocal.

68

12. Purificación de la población mieloide tumoral Cd11b⁺ y de las células de MO de ratones NSG

La fracción mieloide Cd11b⁺ se aisló de los tumores subcutáneos xenotransplantados de MM inducidos en los ratones inmnodeficientes. La disociación tumoral se realizó mediante el uso de un “kit” comercial de disociación de tumores (Miltenyi Biotec) junto con la máquina gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión resultante se marcó con bolas magnéticas Cd11b⁺ (Cd11b Microbeads, Miltenyi Biotec) y la población se separó positivamente por columna. Una vez obtenidas las células purificadas se resuspendieron en un “buffer” de lisis (Macherey-Nagel), suplementado previamente con β-mercaptoetanol, y se extrajo el ARN para la realización de análisis de expresión génica por PCR cuantitativa.

13. Depleción de la población de MØ mediante liposomas de clodronato

Para la depleción *in vivo* de los MØ murinos se usaron liposomas de clodronato, reactivo adquirido del Dr.Nico Van Rooijen (Vrije University, The Netherlands). Una vez que los tumores de MM (NCI-H929; 3x10⁶) alcanzaron un volumen aproximado de 100mm³, una única dosis de clodronato (200μl) se inyectó por vía intravenosa (i.v) en ratones NSG, dos días más tarde se administró el tratamiento combinado GM-CSF+4-IPP y se realizó el seguimiento tumoral como se ha explicado anteriormente.

14. Microscopía confocal multicolor

La captura de imágenes se realizó mediante el microscopio confocal Leica (SP2, Leica Microsystem) con los objetivos de 10xPL-APO NA 0,4 y 20xPL-APO NA 0,7 (con glicerol) utilizados para el screening tisular y la cuantificación de la imagen, respectivamente. Las regiones de interés (ROIs) se segmentaron utilizando el software fiji (National Institute Health, US) y se evaluó la intensidad media de fluorescencia de cada marcador. Se han representado los datos para cada marcador (graphpad Prism 5.0, San Diego California USA).

15. Imagen de células vivas por microscopía

69

MØ-GM y MØ-M (400×10^5), previamente polarizados in vitro, se tiñeron con CFSE violeta (10 minutos, 37°C) y se cultivaron sobre placas de vidrio (Ibidi) tapizadas con fibronectina. Al día siguiente se añadieron las células NCI-H929 (400×10^5) resuspendidas en medio RPMI 10% SBF que contenía AnexinaV-FITC y yoduro de propidio (1:3000 y 1:100, respectivamente). Después de 10 minutos de incubación a 37°C y 5% CO₂ se capturaron imágenes durante 4 horas a intervalos de 10 minutos (para minimizar la fototoxicidad) con una cámara sCMOS (Orca Flash 4.0 LT, Hamamatsu) acoplada a un microscopio invertido (DMi8, Leica-Microsystems), usando un objetivo 40x ACS-APO NA 1.30 (con aceite).

En el caso de los vídeos de las células de MM en presencia de los MØ-M repolarizados se repitió el mismo protocolo salvo que las imágenes se capturaron a intervalos de 10 minutos durante 16 horas, en ausencia de fluorescencia.

16. Retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La extracción del ARN celular se llevó a cabo mediante el “kit comercial” NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído, se cuantificaron la concentración y pureza del ARN por NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoScientific). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el “kit” High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los niveles de ARN mensajero se cuantificaron utilizando

el sistema de sondas UPL (Universal Probe Library, Roche Life Science) mediante el aparato LightCycler480 (Roche Life Science). Los oligonucleótidos usados se diseñaron utilizando el software de Roche y su secuencia se muestra en la **Tabla 10**. La determinación se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos (Roche Life Science) y se normalizó con respecto a los niveles de expresión del gen TBP (Tata binding protein, NM_003194, Roche 101145).

GEN	FORWARD	REVERSE	SONDA	GENE BANK
EGLN3	atgacaggctggtcctcta	gatagcaagccaccattgc	#61	NM_022073.3
FOLR2	gagagaggccaactcagacac	Ccagaccatgtcttctgtcc	#03	NM_001113535.1
INHBA	ctcgagatcatcacgttg	ccttgaaatctgaagtgc	#72	NM_002192.2
TBP	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
MMP12	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
ICAM3	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
STAB1	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
SERPINB2	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
CCL2	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194
CD163	cggctgtttaactcgcttc	cacacgccaagaaacagtga	#3	NM_003194

Tabla 10. Oligonucleótidos de los genes humanos analizados por RT-qPCR

El mismo procedimiento para la extracción de ARN y retrotranscripción se utilizó con las muestras procedentes de ratón. Sin embargo, se usó Syber Green I como método de cuantificación a tiempo real. Los oligonucleótidos para la determinación de los genes murinos también se diseñaron mediante el software de Roche y se adjuntan en la **Tabla 11**.

NOMBRE	FORWARD	REVERSE	GENE BANK
<i>Aldh2</i>	tggtcggggacgtaaaagac	tgaggatttgcacactggt	NM_009656.3
<i>Ccr2</i>	acctgtaaataccatgcaagt	tgtctccatttccttgattg	NM_009915.2
<i>Ccr7</i>	attctacagccccagagc	agcacacctggaaaatgaca	NM_007719.2
<i>Cd11c</i>	tcgtatttggttccaga	ccatcattagacacgtcaca	NM_021334.2
<i>Cd206</i>	ccacagcattgaggagttg	acagctcatcattggctca	NM_001113535.1
<i>Ctla2b</i>	gccctggacaacaaagtct	tgacatcattccaagcaga	NM_007797.1
<i>Egln3</i>	accgctctacagcaagc	agcaagagcagattcagttttc	NM_002415.1
<i>Gas6</i>	tcagcttcggtacaatgg	ccagctctccacggagata	NM_019521.2
<i>Hp6d</i>	gcaggcgtgaacaatgaga	ggcccactgataacagaaacc	NM_008278.2
<i>Inhba</i>	ggaagatgtctccaggcta	tggctggctctcacaggt	NM_010564.4
<i>Inos</i>	tgaactgagcgaggagca	ttcatgataacgtttctggctct	NM_004355.3
<i>IL-10</i>	cagagccacatgctccta	gtccagctggctcttgt	NM_001025158.2
<i>Mgl-1</i>	agaaaacccaagagcctggt	gaggcccaggagagaacag	NM_010796.3
<i>Stab-1</i>	ggaggtcaccatcacttcaa	acccattagctgcgatgta	NM_138672.2
<i>S1pr1</i>	tagcagcccagaccctga	actgggaggggttaatgctt	NM_002192.2

Tabla 11. Oligonucleótidos de los genes murinos analizados por RT-qPCR

17. Otros reactivos

Otros reactivos utilizados en el estudio se muestran en la **Tabla 12**.

REACTIVOS		
NOMBRE REACTIVO	FUNCIÓN	CASA COMERCIAL
CCX733	Antagonista de CXCR7	Cedido por el Dr. Penfold, Chemocentryx
SB225002	Antagonista de CXCR2	Tocris, MO, USA
Anti-CD74	Anticuerpo bloqueante de CD74	Biologend
AMD3100	Antagonista de CXCR4	Sigma Aldrich, St. Louis, USA.

Tabla 12. Otros reactivos usados en el estudio.

18. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se desarrollaron usando la prueba t-test de student's, con un p-valor < 0,05 considerado estadísticamente significativo. También se llevaron a cabo análisis estadísticos en columna utilizando "One-Sample t-test (con un valor hipotético de 1). (*P < 0.05; **p < 0.01; y ***p < 0.001).

RESULTADOS

OBJETIVO 1

Estudio del comportamiento de diferentes estados de polarización de macrófagos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios con respecto a las células tumorales de MM.

1. Diferenciación de MØ-GM y MØ-M y estudio comparativo de su función anti-tumoral o pro-tumoral en presencia de células tumorales de MM tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.1 Características fenotípicas de los MØ-GM y MØ-M diferenciados *in vitro*.

El sistema de diferenciación utilizado en este trabajo para la obtención de MØ ha sido el cultivo de monocitos humanos procedentes de sangre periférica en presencia de las citoquinas GM-CSF o M-CSF, obteniendo de esta manera MØ-GM (de tipo M1) o MØ-M (de tipo M2), respectivamente (**ver esquema de diferenciación Figura 5A**). Para comprobar la correcta diferenciación de estas células, se realizaron análisis fenotípicos mediante el estudio por citometría de flujo y por PCR cuantitativa de marcadores de polaridad GM/M ([Escribese et al., 2012](#); [Estecha et al., 2012](#); [Puig-Kroger et al., 2009](#); [Sierra-Filardi et al., 2011](#)). Estos análisis confirmaron una mayor expresión a nivel génico y de proteína de CD163 y del receptor de folato beta (FR β , codificado por *FOLR2*), mayor ARN mensajero (ARNm) de *STAB1*, *SERPINB2* y *CCL2*, y menor expresión de los marcadores *ICAM3*, *EGLN3*, *INHBA* y *MMP12* en los MØ-M, en comparación con los MØ-GM (**Figura 5 B-C**).

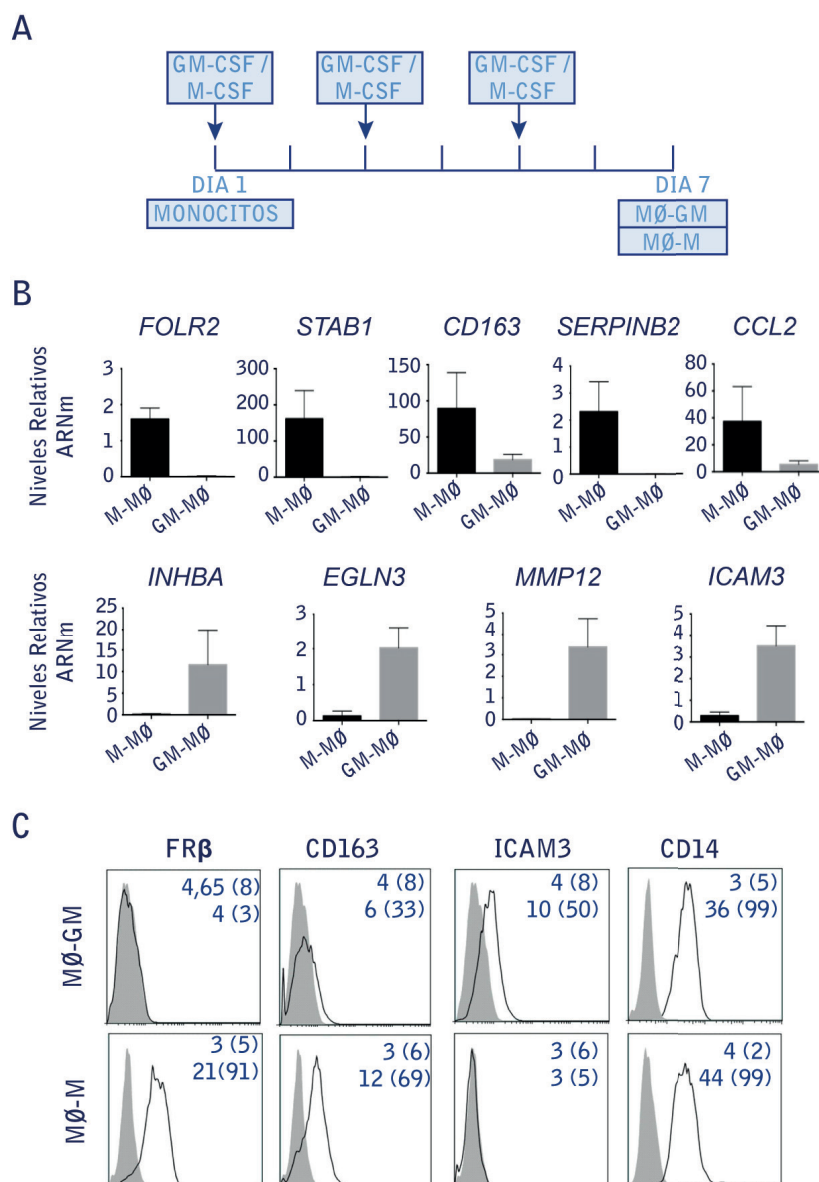


Figura 5. Esquema de diferenciación de MØ *in vitro* y análisis fenotípico por citometría de flujo y PCR cuantitativa en MØ-GM y MØ-M. **A.** Representación de la diferenciación de monocitos en cultivo durante 7 días en presencia de la citoquina GM-CSF, para la generación de MØ-GM, y de M-CSF para MØ-M. **B.** Niveles relativos de expresión de *FOLR2*, *STAB1*, *CD163*, *SERPINB2*, *CCL2*, *INHBA*, *EGLN3*, *MMP12* e *ICAM3* en MØ-GM (de tipo M1) y M-MØ (de tipo M2) medidos por PCR cuantitativa. **C.** Detección de los marcadores FRβ, CD163, ICAM3 y CD14 mediante citometría de flujo en la superficie de los MØ-GM y M-MØ. En cada panel se muestra la intensidad media de fluorescencia y el porcentaje de células positivas (entre paréntesis) del control negativo y del marcador analizado en cada caso. Los experimentos se repitieron en 10 donantes diferentes \pm SEM y se muestra en el apartado C un experimento representativo.

1.2 Estudio de la función anti-tumoral o pro-tumoral de los MØ-GM y MØ-M cultivados en presencia de las células de MM.

Para determinar el papel citotóxico o protector de los MØ hacia las células tumorales de MM se llevaron a cabo experimentos de co-cultivo, en los cuales las células de MM se añadieron directamente sobre los MØ-GM o MØ-M, previamente diferenciados *in vitro*. Se utilizaron 6 donantes diferentes de MØ y se mantuvieron en co-cultivo durante 72 horas, para posteriormente analizar por citometría de flujo la muerte celular del MM mediante la co-tinción con AnexinaV y Yoduro de propidio (AnxV/YP). La tinción con CD14 se llevó a cabo para poder excluir la población de MØ del análisis, permitiéndonos poder seleccionar la población negativa para este marcador y así, a continuación, analizar la muerte únicamente en las células de MM (**ejemplo del análisis en un donante representativo de un co-cultivo de MØ-GM+MM en la Figura 6A**). En los co-cultivos con los MØ-GM, las células de MM presentaron un incremento de la muerte celular de 15 ± 6 veces en el caso de las líneas NCI-H929 y MM.1S, y de 7 ± 4 veces de la línea U266, en comparación con el cultivo de las células solas o en presencia de los MØ-M (**cuantificación en Figura 6B y paneles “dot plot” de citometría AnxV+/YP+ de co-cultivos representativos en Figura 6C**). Más aún, se puede observar como el co-cultivo con los MØ-M incluso aportó supervivencia a ciertas líneas de MM, como a la línea U266 y a la MM.1S, reduciendo los niveles de muerte en estas células por debajo de la muerte basal (**Figura 6B**).

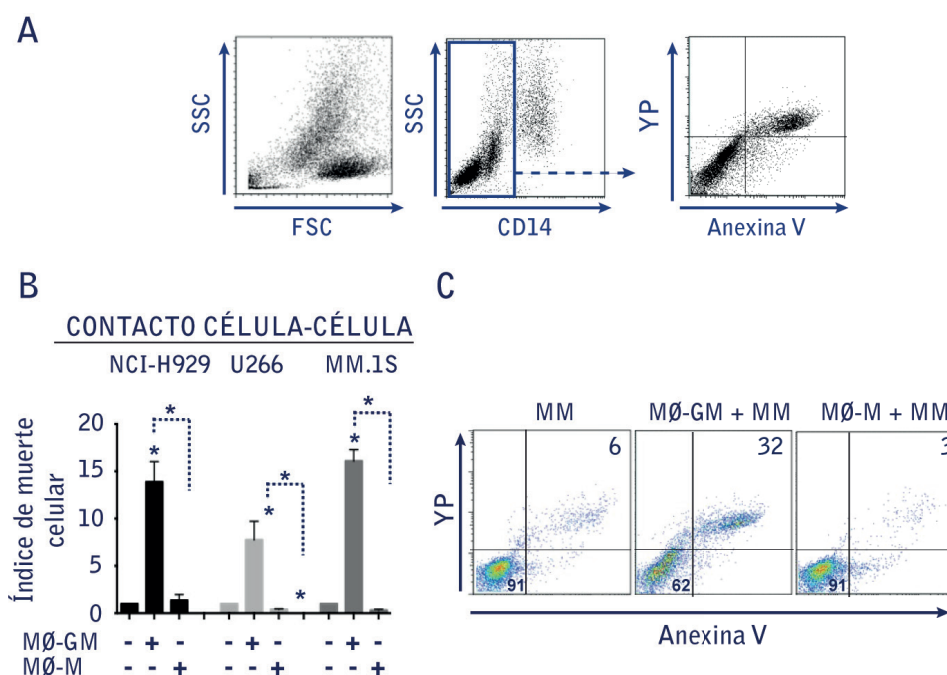
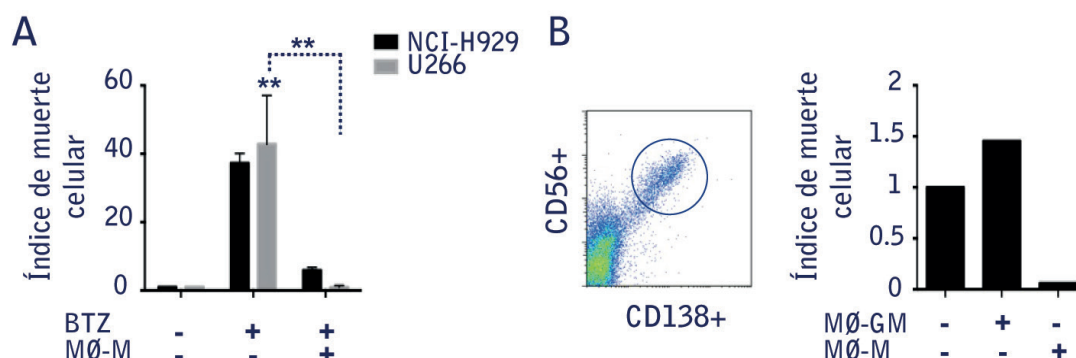


Figura 6. Co-cultivo de diferentes líneas celulares de MM con MØ-GM y MØ-M. **A.** Se muestra el tipo de análisis realizado por citometría en los co-cultivos MØ+MM. En el panel de la izquierda, se muestra un perfil de tamaño/complejidad (SSC/FSC) de un co-cultivo de MØ-GM+MM. En el panel central, se muestra como la tinción con CD14-APC permite excluir del análisis la población de MØ CD14+. La población negativa para CD14 se analiza seguidamente con la doble tinción AnxV/YP, panel derecho. Se muestra el análisis de un experimento representativo. El mismo procedimiento se siguió en los co-cultivos MØ-M+MM (datos no mostrados). **B.** Se muestra el incremento de muerte celular de tres líneas de MM (NCI-H929, MM.1S y U266) cultivadas solas o en presencia de los MØ-GM o MØ-M. Se realizaron 6 experimentos independientes con diferentes donantes \pm SEM (* p <0.05; ** p <0.005; *** p <0.001). **C.** “Dot plots” de citometría de flujo mostrando la doble tinción AnxV+/YP+ en las células de MM cultivadas solas o en co-cultivo con los MØ-GM y MØ-M. En la figura se muestra el porcentaje de células muertas en cada condición (cuadrante derecho superior) y el porcentaje de células vivas (cuadrante inferior izquierdo). Se muestra un experimento representativo.

Teniendo en cuenta estos resultados se llevaron a cabo experimentos de co-cultivo de las células de MM (NCI-H929 y U266) con los MØ-M en presencia del fármaco inhibidor del proteasoma bortezomib. Fármaco que se utiliza actualmente en el tratamiento de la enfermedad e induce citotoxicidad en las células de MM (Cavo, 2006). La **Figura 7A** muestra como los MØ-M son capaces de proteger a las células tumorales de MM de una muerte inducida cuando se encuentran en co-cultivo, produciéndose una disminución de forma destacada de la muerte celular en ambas líneas celulares NCI-H929 y U266, en esta última causando una reducción de prácticamente el 100%.

Por otro lado, para estudiar el comportamiento de los MØ en presencia de células primarias de MM, se realizaron co-cultivos de los MØ-GM y MØ-M con células recién purificadas de un paciente con una alta infiltración de células tumorales en la MO, como se puede comprobar

en la **Figura 7B** mediante la tinción con los marcadores de MM CD138 y CD56 (panel de citometría; izquierda). Los MØ-M fueron capaces de revertir la muerte basal que presentaban las células tumorales *ex vivo*, mientras que los MØ-GM indujeron su muerte celular en un 50% (**Figura 7B; derecha**).



83

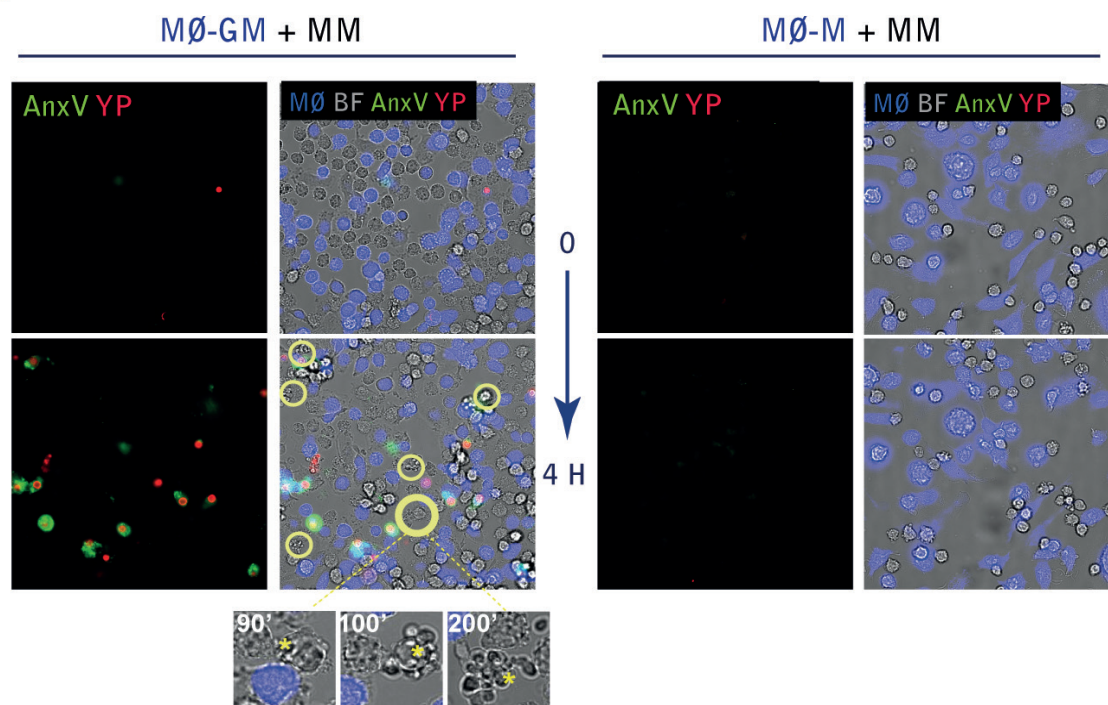
Figura 7. Estudio del papel protector de los MØ-M en co-cultivo con líneas celulares y células primarias de MM. **A.** Las líneas de MM (NCI-H929 y U266) se cultivaron con los MØ-M en presencia de bortezomib (BTZ; 10nM). La gráfica representa el incremento de muerte celular del MM en cada condición. Se muestra la media de tres experimentos con diferentes donantes \pm SEM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$). **B.** Panel de citometría mostrando la población de células primarias de MM CD138+/CD56+ y se representa en la derecha la muerte celular del cultivo *ex vivo* (48 horas) de las células primarias CD138+ en presencia de MØ-GM y MØ-M.

1.3 Vídeo-microscopía de los co-cultivos de las células de MM con los MØ-GM o MØ-M.

Con el fin de ilustrar los fenómenos que estaban sucediendo entre las células de MM y los MØ-GM o MØ-M se realizaron vídeos por microscopía de las células de MM en co-cultivo con los MØ (**Figura 8A y Vídeos 1 y 2, véanse en el CD adjuntado al final de la tesis doctoral**). Para poder diferenciar bien ambas poblaciones durante la secuencia, los MØ (tanto MØ-GM como MØ-M) se tiñeron con CFSE y las células de MM (NCI-H929) se añadieron en presencia de AnxV (verde)/YP (rojo) para la visualización de la muerte celular. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4 horas y se capturaron imágenes a intervalos de 10 minutos. En los co-cultivos con los MØ-GM un gran número de células de MM presentó una rápida adquisición simultánea de AnxV+/YP+, sugiriendo una muerte celular por necrosis, ya que una vez que la membrana plasmática se rompe no sólo el YP penetra en el interior de la célula sino que la AnxV también se incorpora (**Vídeo 1**). Pero no se apreció únicamente muerte celular por necrosis, ya que una alta proporción de las células tumorales se tiñeron sólo con

AnxV, que se une a residuos de fosfatidilserina (FS) expuestos en el exterior de las células, y posteriormente acabaron formando cuerpos apoptóticos, indicativo de una muerte celular por apoptosis (**Vídeo 1**). Durante las primeras fases de este tipo de muerte la membrana celular permanece intacta, por lo que el YP no puede penetrar en el interior de la célula y no se produce la tinción del núcleo. Sin embargo, al final del proceso (apoptosis tardía) ambos agentes acaban penetrando en el interior de la célula. De manera opuesta, un numero muy bajo de células de MM cultivadas solas o en presencia de MØ-M (**Vídeo 2**) se tiñeron con AnxV y/o YP. En la **Figura 8B** se pueden observar aumentos de ambos tipos de muerte inducidas por los MØ-GM, en la parte superior se muestra una secuencia representativa de muerte por apoptosis, que comienza con la tinción del residuo de FS y termina con la formación de cuerpos apoptóticos. En la parte inferior se muestra una secuencia de muerte por necrosis donde la célula se tiñe de manera simultánea con AnxV+/YP+. Estos resultados indicaron que los MØ-GM son capaces de inducir ambos tipos de muerte celular programada en las células de MM, tanto apoptosis como necrosis.

A



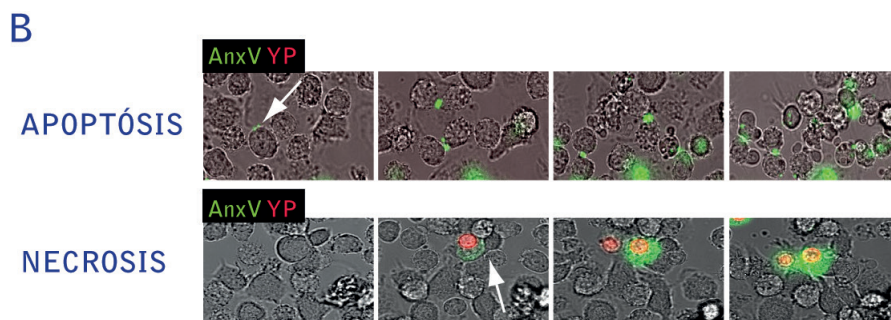


Figura 8. Vídeo-microscopía de los co-cultivos de los MØ-GM y MØ-M con el MM. A. Las células de MM (NCI-H929) se añadieron sobre los MØ-GM o MØ-M teñidos con CFSE en presencia de AnxV/YP y se capturaron imágenes durante 4 horas a intervalos de diez minutos. Las imágenes oscuras muestran la fluorescencia correspondiente a la doble tinción con AnxV (verde) y YP (rojo). En las imágenes en campo claro se muestra además la población de MØ (azul). Los círculos amarillos muestran las células apoptóticas. **B.** Secuencia de 4 imágenes aumentadas mostrando la muerte por apoptosis, indicado por la tinción en verde del residuo de FS, y la muerte por necrosis, indicado por la doble incorporación de AnxV+(verde)/YP+(rojo).

85

1.4 Estudio comparativo del papel de los MØ-GM y MØ-M en la proliferación *in vitro* de las células de MM.

Para poder estudiar el efecto de la presencia de los MØ-GM y MØ-M sobre la proliferación de las células de MM en co-cultivo, se realizaron ensayos de proliferación mediante el método por dilución con CFSE, un agente que permite el seguimiento de las células que se encuentran en división mediante la pérdida de fluorescencia (ver materiales y métodos). Las células de MM teñidas con CFSE se cultivaron con los MØ-GM o MØ-M durante 72 horas y se analizó la proliferación del MM mediante citometría de flujo. Puesto que son experimentos en los que ambas poblaciones están en contacto directo se utilizó la tinción con CD14-PerCP y 7-AAD, para poder excluir tanto la población de MØ como de células muertas del análisis, respectivamente. Como se puede observar en la **Figura 9**, el co-cultivo con los MØ-M produce una disminución progresiva de la fluorescencia en las células de MM a las 48 y 72 horas, lo que indica división celular. Sin embargo, las células de MM cultivadas en presencia de los MØ-GM mantuvieron en su mayoría la tinción con CFSE sin diluir, indicativo de que las células no se estaban dividiendo, en comparación con las células de MM cultivadas solas, que presentaron unos niveles de fluorescencia de CFSE intermedios. En base a estos resultados se puede decir que los MØ-M inducen la proliferación de las células de MM *in vitro* y que por el contrario, los MØ-GM inhiben su proliferación.

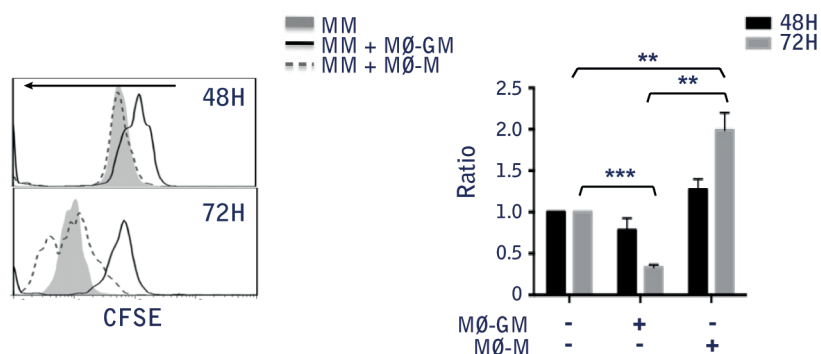


Figura 9. Efecto de los MØ-GM y MØ-M en la proliferación de las células de MM *in vitro*. Las células de MM se tiñeron con CFSE y se cultivaron durante 48 y 72 horas en ausencia o en presencia de MØ-GM o MØ-M. La proliferación del MM se analizó mediante la pérdida de CFSE por parte de las células en división. Se muestra el histograma de fluorescencia de CFSE de un experimento representativo a las 48 y 72h (panel de la izquierda) y se ilustra la media del valor de la Intensidad media de fluorescencia (MEAN) de tres experimentos \pm SEM, normalizado con respecto al valor de la línea cultivada sola (gráfica de la derecha) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

1.5 Análisis *in vivo* del efecto de los MØ-GM y MØ-M en el desarrollo tumoral en ratones xenotransplantados con células de MM.

Puesto que ambos tipos de MØ mostraron un efecto opuesto sobre la proliferación y la supervivencia de las células de MM *in vitro*, se decidió estudiar la posible repercusión de los MØ en el desarrollo tumoral *in vivo*. Para ello se realizó un modelo de xenotransplante de MM en ratones NSG, en el cual se inyectaron subcutáneamente células de MM solas (NCI-H929) o mezcladas con MØ-GM o MØ-M. La extracción tumoral pasados 10 días desde la inyección reveló que las células co-inyectadas con los MØ-M desarrollaron mayor volumen tumoral en comparación con el tamaño intermedio que presentaron las células inyectadas solas o las células co-inyectadas con los MØ-GM, que desarrollaron los tumores más pequeños (**Figura 10A**). Resultados similares se obtuvieron en un modelo de ratón alternativo en el que los MØ-GM o MØ-M se inyectaron intratumoralmente una vez que los tumores alcanzaron 100mm³ (**Figura 10B**). Estos datos indicaron que los MØ-M inducen la progresión tumoral de las células de MM *in vivo* y que los MØ-GM, por otro lado, la limitan.

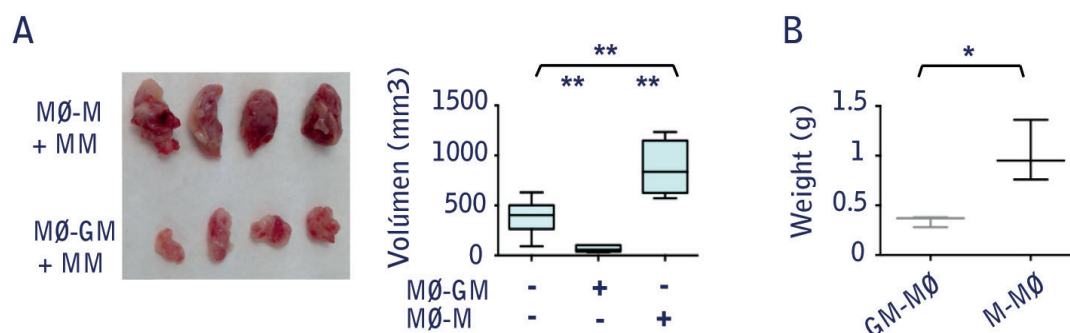
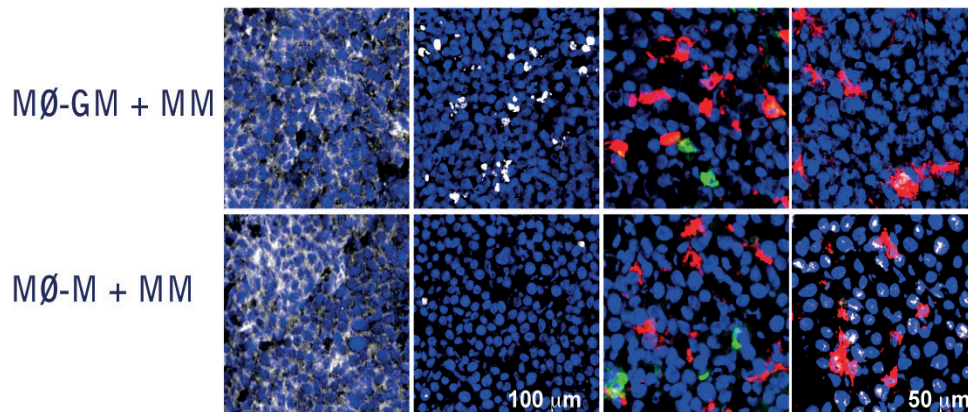


Figura 10. Estudio del papel de los MØ-GM y MØ-M en el desarrollo tumoral *in vivo*. **A.** Las células NCI-H929 (3×10^6) mezcladas con los MØ-GM y MØ-M (ratio 1:1) se inyectaron subcutáneamente en el flanco de ratones NSG, a los 10 días se procedió a su sacrificio y posterior medida del volumen tumoral (mm³). Se muestra la imagen comparativa de los tumores de MM inyectados con ambos tipos de MØ y se representa en la gráfica el volumen tumoral. **B.** Los MØ-GM y MØ-M se inyectaron intratumoralmente en tumores subcutáneos de MM (NCI-H929; 3×10^6) una vez que alcanzaron los 100mm³. Pasados 10 días se procedió a la extracción y medida del peso tumoral (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

87

Con el fin de comprobar si la diferencia observada en la **Figura 10A** en el crecimiento tumoral entre los tumores de MM co-inyectados con MØ-GM o MØ-M era debido a un efecto causado directamente sobre la población de las células tumorales y no a una diferencia de crecimiento entre las poblaciones de MØ inyectadas, los tumores se extrajeron y se procedió a su estudio por inmunofluorescencia (**Figura 11**). La tinción con diferentes marcadores mostró la misma densidad de células de MM (CD38/CD138), de MØ humanos (CD163), de leucocitos murinos y de MØ murinos (Cd45 y F4/80), respectivamente, entre ambos tipos de tumores MØ-GM+MM y MØ-M+MM. Por otra parte, la tinción con el marcador de proliferación Ki67 mostró un aumento de 45 ± 18 veces de la proliferación de las células de MM cuando se inyectaron junto con los MØ-M, en comparación con las células de MM co-inyectadas con los MØ-GM, donde no se detectó prácticamente proliferación. Sin embargo, en los tumores MØ-GM+MM las células de MM se tiñeron en su mayoría con el marcador de apoptosis caspasa 3 (activada), indicando la muerte celular del MM. En conjunto, estos resultados mostraron que los MØ-GM fueron capaces de frenar el crecimiento tumoral *in vivo* a través de la inducción de la apoptosis sobre las células de MM y que por el contrario, los MØ-M promovieron el crecimiento tumoral a través de la inducción de la proliferación sobre estas células tumorales.

CD38/CD138 Caspasa 3 F4/80 CD163 Cd45 Ki67



88

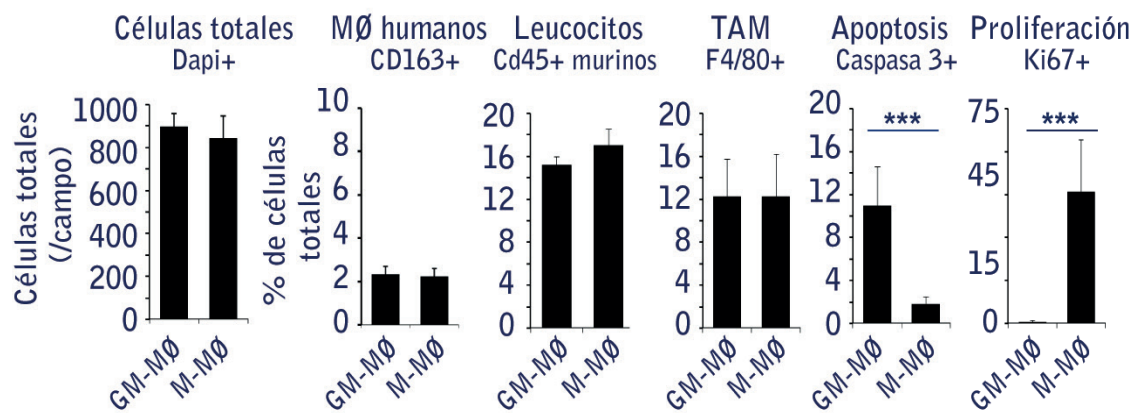


Figura 11. Análisis por inmunofluorescencia del efecto de los MØ-GM y MØ-M sobre la proliferación y la apoptosis en el desarrollo tumoral *in vivo*. Inmunofluorescencia de los tumores de MM co-inyectados con los MØ-GM o MØ-M teñidos con los marcadores CD38/CD138 (MM), CD163 (MØ humanos), F4/80 (MØ murinos), Cd45 (leucocitos murinos), Ki67 (proliferación) y caspasa 3 activa (apoptosis). Los núcleos celulares aparecen en azul en todos los casos. En la parte inferior se muestra la cuantificación de cada marcador referido al número total de células o al número total de células por campo.

1.6 Estudio *in vitro* de la respuesta de las células de MM cultivadas en presencia de varios estados de polarización de MØ y del fenómeno de cross-activación que ocurre entre ambas poblaciones cuando se encuentran en co-cultivo.

1.6.1 Estudio comparativo de varios estados de polarización/activación de MØ en co-cultivo con las células de MM en presencia o ausencia de contacto celular.

Puesto que existen diferencias en cuanto a los protocolos de diferenciación de MØ, quisimos exponer a los MØ-GM y MØ-M a diversos estímulos y analizar su respuesta hacia el MM. Para ello estimulamos durante 24 horas con LPS/INF- γ a los MØ-GM (MØ-LPS/INF) y con IL-4 a los MØ-M (MØ-IL-4) (**ver protocolo en Figura 12A**), y así poder comparar el comportamiento de los MØ-GM y MØ-M con MØ que presentaban un estado de activación mayor. Seguidamente repetimos los experimentos de co-cultivo, descritos anteriormente, con las líneas celulares NCI-H929, U266 y MM.1S. El análisis de los co-cultivos mostró un aumento de prácticamente el doble de la muerte celular en el caso de la línea NCI-H929 cuando se encontraba en presencia de los MØ-LPS/INF, en comparación con los MØ-GM (**Figura 12B**). Sin embargo, un pequeño aumento se observó en el caso de la línea U266 y no se detectó diferencia en la línea MM.1S. En cuanto a los co-cultivos con los MØ-IL-4 no se encontraron diferencias respecto a los MØ-M sin estimular. Estos resultados sugirieron que una mayor activación del MØ-GM con LPS e INF- γ puede incrementar su potencial citotóxico respecto a ciertas líneas de MM.

Los MØ son células equipadas con una amplia maquinaria de mecanismos citotóxicos que pueden ser tanto dependientes como independientes de contacto celular ([Klimp et al., 2002](#)). Para determinar si la actividad citotóxica y el papel protector frente al MM, previamente observados en los MØ-GM y MØ-M, respectivamente, eran dependientes de contacto célula-célula, y que esta diferencia en el comportamiento no era debida a una distinta capacidad fagocítica entre ambos tipos de MØ, usamos el sistema de co-cultivo en transwell. Se usaron transwell de 0,4 μ m, tamaño de poro que permite el intercambio de sustancias entre ambos tipos celulares pero que no deja el paso libre de las células de un compartimento a otro. Los

MØ-GM y MØ-M se diferenciaron en la cámara inferior de la placa de transwell y las células de MM (NCI-H929, U266 Y MM.1S) se añadieron en la parte superior donde se dejaron en co-cultivo durante 72 horas (**Figura 12C**). Los resultados muestran que los MØ-GM, y de manera incrementada los MØ-LPS/IFN, retienen su habilidad citotóxica frente al MM en ausencia de contacto celular, aunque en menor medida que en los co-cultivos directos, mientras que los MØ-M no alteraron la viabilidad de las células de MM en este sistema. Por otro lado, puesto que el sistema en transwell utilizado previene la fagocitosis por parte de los MØ, se puede decir que el diferente comportamiento entre ambos tipos de MØ frente al MM no es debido a una distinta capacidad fagocítica entre estas células. Estos datos sugirieron que, además del contacto celular, hay otros factores citotóxicos que se secretan involucrados en la actividad citotóxica de los MØ-GM.

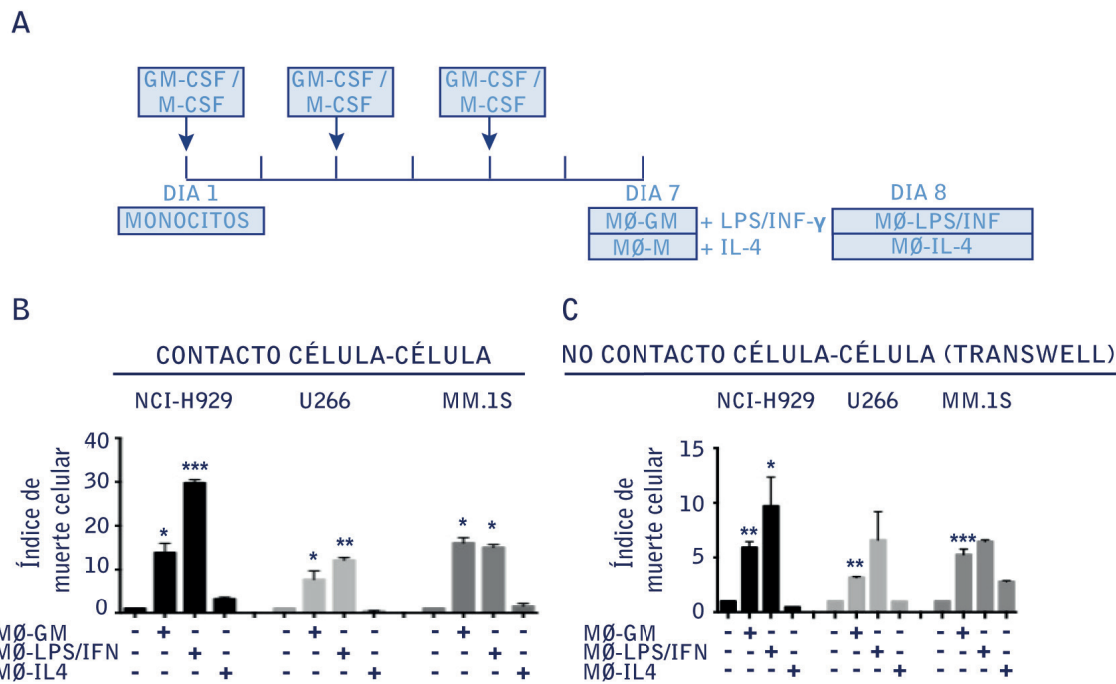


Figura 12. Co-cultivo de las células de MM en presencia de varios estados de polarización de MØ. A. Esquema del protocolo de estimulación seguido en los MØ-GM y MØ-M. **B-C.** La muerte celular del MM se analizó después de 72 horas de co-cultivo de las células de MM solas o en presencia de MØ-GM, MØ-LPS/IFN y MØ-IL-4, en experimentos de contacto directo célula-célula (A), y en experimentos de co-cultivo en transwell (tamaño de poro 4µm) en ausencia de contacto celular (B). Se muestra la media de al menos tres experimentos con diferentes donantes ±SEM (*, p<0.05; **, p<0.01, ***p<0.001).

1.6.2 Estudio del factor TNF- α y de la citoquina IL-12 en la citotoxicidad mediada por los MØ-GM sobre las células de MM.

Puesto que los resultados mostraron la existencia de moléculas solubles involucradas en la muerte provocada por los MØ-GM sobre el MM, quisimos estudiar posibles moléculas responsables de la inducción de este fenómeno. La primera molécula que se analizó fue TNF- α , factor principalmente secretado por los MØ con capacidad para ejercer un papel citotóxico en muchos tipos de células tumorales (Wajant, 2015). Ensayos de ELISA revelaron la ausencia de TNF- α en los sobrenadantes provenientes tanto de los MØ-GM o MØ-M como de las células de MM cuando se cultivaron de manera aislada (**Figura 13A**). Sin embargo, una inducción significativa de TNF- α se produjo en los sobrenadantes procedentes de los co-cultivos de las células de MM con los MØ-GM, al contrario que en los co-cultivos del MM con los MØ-M, donde no se detectó presencia de este factor. Por otro lado, se encontraron altos niveles de TNF- α en los sobrenadantes procedentes de los MØ-LPS/IFN, niveles que se indujeron aún más cuando estos MØ se encontraron en co-cultivo con las células de MM. La siguiente molécula que se analizó fue IL-12, la cual ha emergido como una potente citoquina antitumoral a través de su interacción con numerosas células del sistema inmune englobando tanto el sistema innato como el adaptativo (Tugues et al., 2015). De manera similar al TNF- α , ni el MM ni los MØ-GM o MØ-M secretaron IL-12 al medio, sin embargo, su producción se indujo de manera significativa en los co-cultivos de los MØ-GM+MM así como en los co-cultivos de los MØ-LPS/IFN+MM. Estos datos mostraron que existe un proceso de “cross-activación” entre los MØ-GM y las células de MM cuando se encuentran en co-cultivo, y que conlleva a la producción de TNF α y de IL-12 al medio, en comparación con la ausencia de producción de ambas moléculas en los co-cultivos de los MØ-M+MM. Además, estos resultados señalan a TNF α e IL-12 como posibles moléculas que podrían estar involucradas en la muerte del MM mediada por los MØ-GM.

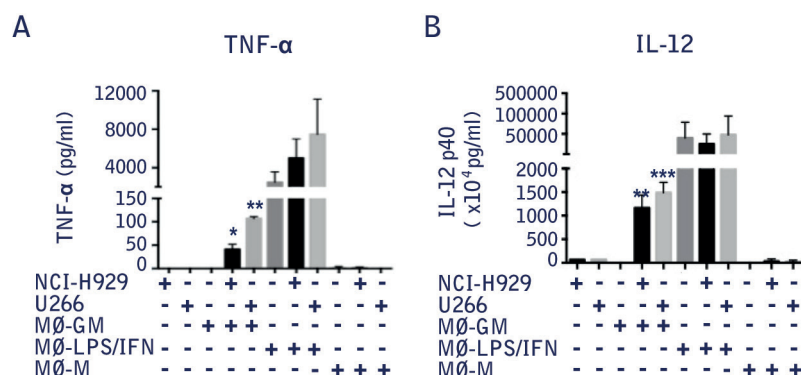


Figura 13. Proceso de “cross-activación” en los co-cultivos de los MØ-GM con las células de MM. A-B. Determinación por ELISA de los niveles de TNF α (A) y de IL-12 p40 (B) en los sobrenadantes recogidos después de 48 horas de cultivo de las líneas de MM (NCI-H929 y U266), de varios tipos de MØ (MØ-GM, MØ-LPS/IFN y MØ-M) y de co-cultivos de los MØ-GM, MØ-LPS/IFN y MØ-M con ambas líneas celulares de MM. Se muestra en cada caso la media de al menos tres experimentos con diferentes donantes \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Puesto que el TNF α se considera uno de los mediadores mas importantes de la respuesta innata anti-tumoral y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió utilizar el anticuerpo bloqueante de TNF α infliximab en los medios condicionados de los co-cultivos MØ-GM+NCI-H929 y MØ-GM+U266 que contenían este factor, y que previamente se habían medido por ELISA en la **Figura 13A**. En la **Figura 14** se muestra como el sobrenadante procedente del co-cultivo MØ-GM+NCI-H929 es capaz de inducir la muerte celular de la línea sensible a TNF α NCI-H929 y como el uso de infliximab consigue su reversión en aproximadamente un 50%. Por otro lado, sólo se vio una reducción de la muerte celular de la línea resistente a TNF α U266 cuando el sobrenadante procedente del co-cultivo MØ-GM+U266 se inactivó mediante altas temperaturas. Estos resultados sugieren que el TNF α está implicado en la muerte inducida por los MØ-GM sobre ciertas líneas de MM aunque existen otras moléculas solubles secretadas, diferentes a TNF α , involucradas en la muerte del MM.

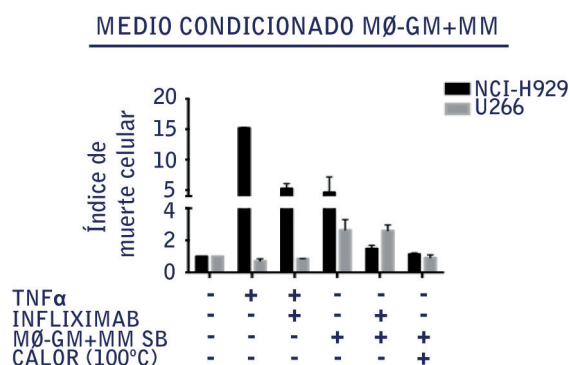


Figura 14. Inhibición de la molécula TNFα mediante el anticuerpo bloqueante infliximab. Las líneas NCI-H929 y U266 se cultivaron en presencia de TNFα (200ng/ml) o en presencia de sobrenadantes (SB) procedentes de los co-cultivos MØ-GM+NCI-H929 o MØ-GM+U266, respectivamente (medidos por ELISA en 13A) y se trataron con el anticuerpo infliximab (80 µg/ml) como se indica en la figura. Los sobrenadantes de los co-cultivos se inactivaron mediante altas temperaturas (10 minutos a 100°C).

93

Para evitar los procesos de cross-activación observados en los sistemas de co-cultivo entre los MØ y el MM, realizamos experimentos donde se cultivaron las líneas de MM en presencia únicamente de los medios condicionados procedentes de los MØ. La **Figura 15** muestra como el sobrenadante de los MØ-GM, y de manera incrementada el de los MØ-LPS/IFN, siguió manteniendo su capacidad citotóxica frente a las líneas NCI-H929 y U266, aunque en menor medida en esta última. Por otro lado, el medio condicionado de los MØ-M no afectó la viabilidad de las células de MM. Estos resultados denotan el potencial citotóxico que poseen los factores solubles presentes en el medio condicionado de los MØ de tipo M1 (MØ-GM y MØ-LPS/IFN)

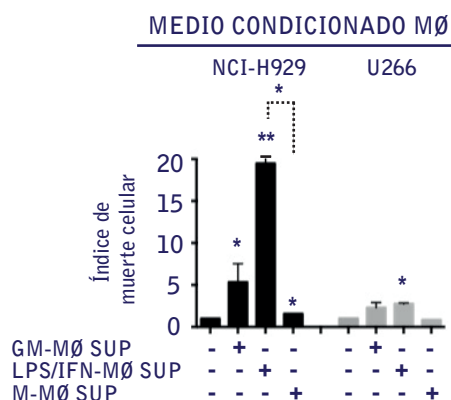


Figura 15. Cultivo de las células de MM en presencia de los medios condicionados de los MØ. El medio condicionado (SB) de los MØ-GM, MØ-LPS/IFN y de los MØ-M se recogió y se añadió a las líneas celulares NCI-H929 y U266 (50% v/v). La muerte celular del MM se midió después de 72 horas de cultivo. Se muestra la media de al menos tres experimentos con diferentes donantes ±SEM (*, p<0.05; **, p<0.01, ***p<0.001).

1.6.3 Estudio de otras posibles moléculas implicadas en la citotoxicidad mediada por los MØ-GM.

Además del TNF α , los MØ son capaces de inducir la muerte celular mediante otros mediadores citotóxicos, como pueden ser la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), mediante el complejo inductor de la apoptosis Fas/Fas-ligando, la liberación de activina o a través de la liberación de proteasas celulares (metaloproteasas (MMPs) y proteasas de aminoácidos) capaces de interrumpir vías de señalización necesarias para la homeostasis celular provocando la muerte de la célula (Coursey et al., 2012; Laskin et al., 2011). Con el fin de profundizar en los mecanismos de muerte mediados por los MØ-GM se intentó, en primer lugar, bloquear algunas de estas vías directamente en los co-cultivos de MØ-GM+NCI-H929 y para ello se usó el bloqueante de TNF α infliximab, un anticuerpo bloqueante de activina, un bloqueante de ROS llamado BHA, el inhibidor Kp7-6 del complejo Fas/Fas-ligando y un inhibidor extracelular de proteasas. En la **Figura 16A** se muestra como ninguno de los agentes utilizados fue capaz de frenar la muerte del MM inducida por los MØ-GM en co-cultivos directos, donde existe contacto celular. En base a estos resultados, se quiso observar si mediante el uso de los agentes bloqueantes, anteriormente citados, se lograba una disminución o reversión de la muerte del MM inducida únicamente mediante los medios condicionados de los MØ-GM, es decir, la reversión de una muerte inducida a través de mecanismos independientes de contacto celular. Para ello, se cultivó la línea NCI-H929 en presencia del sobrenadante de los MØ-GM durante 72 horas en presencia de infliximab, el anticuerpo bloqueante de activina y de los inhibidores de proteasas (**Figura 16B**). Ninguno de los agentes por separado fue capaz de disminuir la muerte en el MM, sin embargo, sí se observó reducción de ésta mediante el uso de todos los agentes en conjunto. Estos resultados mostraron que en los co-cultivos de contacto celular directo existen mecanismos de muerte tanto dependientes como independientes de contacto celular, y que el uso de inhibidores o bloqueantes contra los mediadores citotóxicos secretados no es suficiente para lograr una reversión de la muerte inducida por los MØ-GM, que únicamente se ve reducida cuando la inhibición se realiza en los cultivos de MM en presencia del sobrenadante de los MØ-GM.

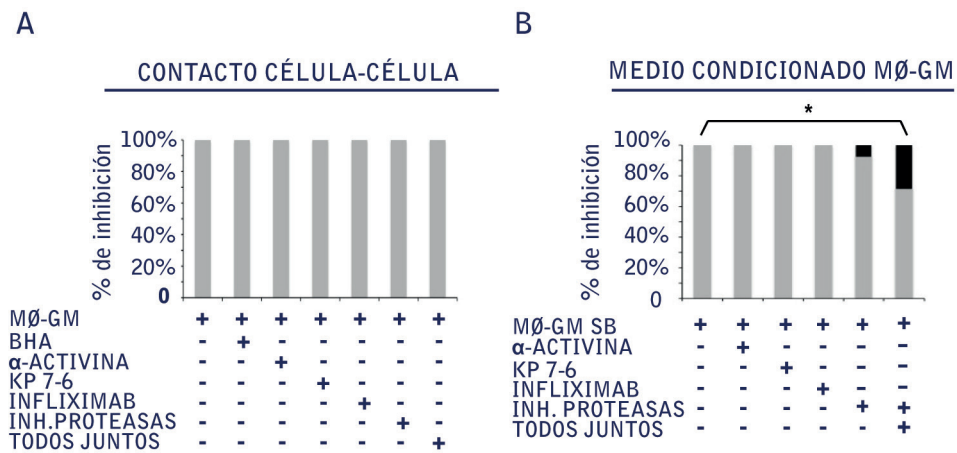


Figura 16. Inhibición de la muerte celular inducida por los MØ-GM sobre las células de MM. A-B. Los agentes BHA (100 μ M), Kp 7-6 (500 μ g/ml), anti-activina (5 μ g/ml), infliximab (50 μ g/ml) y un cóctel de inhibidores de proteasas (1:200) se añadieron por separado o en conjunto sobre las células de MM cultivadas en presencia de los MØ-GM (contacto célula-célula) (**A**) o sobre las células de MM cultivadas en presencia del medio condicionado de los MØ-GM (ausencia de contacto célula-célula) (**B**).

OBJETIVO 2

Análisis fenotípico de la población de TAMs asociados a MM en muestras de pacientes.

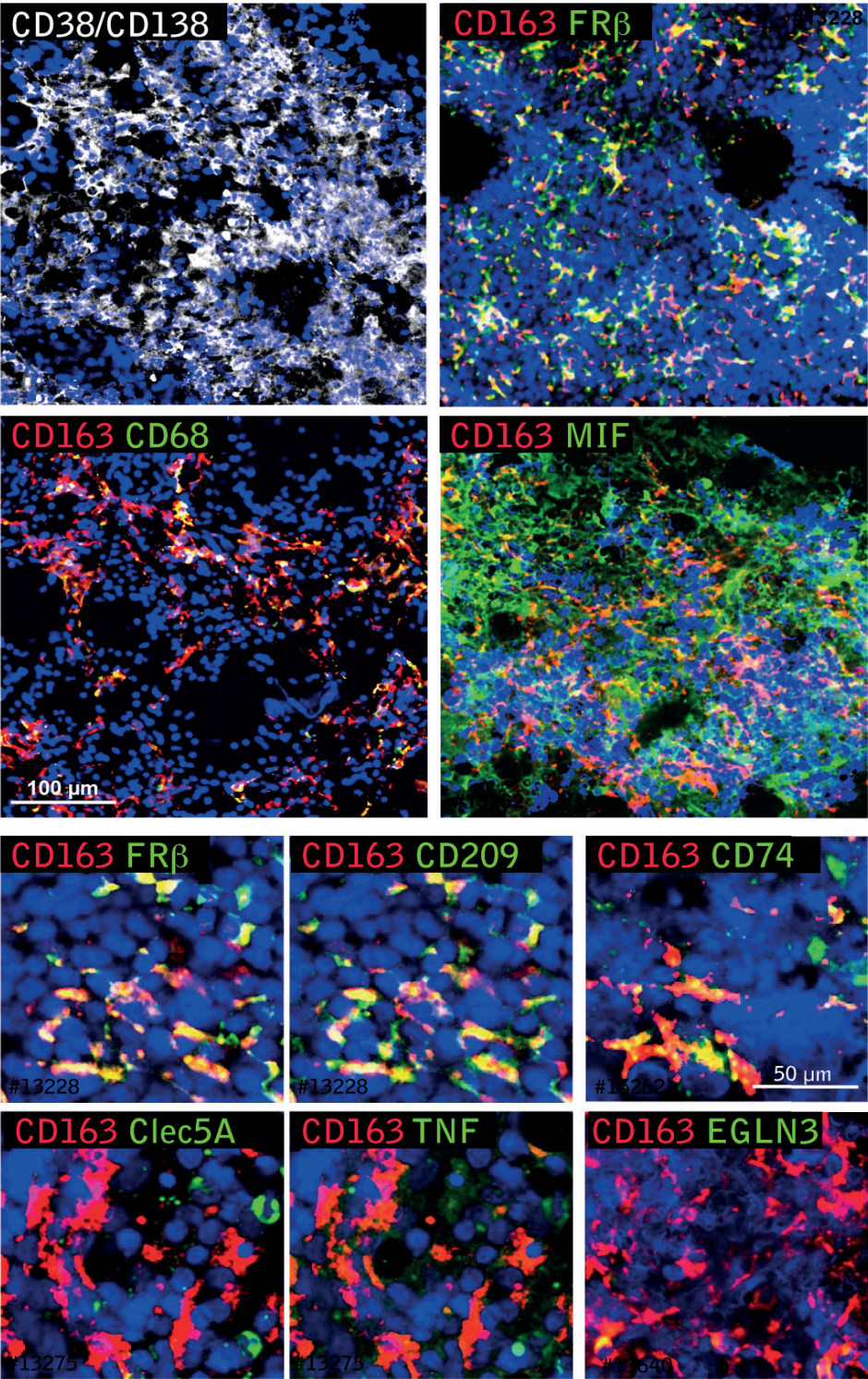
2. Estudio de marcadores de expresión asociados a polaridad de MØ M1/M2 en TAMs de aspirados de MO de pacientes con MM.

Se ha descrito en muchos tipos de cáncer que los TAMs presentan generalmente un fenotipo M2, promovido por el microambiente tumoral y que está asociado en la mayoría de los casos con progresión tumoral (Sica and Mantovani, 2012; Zaynagetdinov et al., 2011). Para estudiar este aspecto en muestras humanas de MM, se decidió realizar un análisis fenotípico por microscopía confocal en los grumos medulares de pacientes con una alta infiltración de CPs en MO, que detectamos mediante los marcadores tumorales de MM CD138+/CD38+ (**Figura 17A**). Con el fin de identificar y abarcar toda la población de MØ en las muestras se usó una combinación de los marcadores de MØ CD68 y CD163 (Gonzalez-Dominguez et al., 2015). El análisis conjunto de estas dos moléculas demostró una alta expresión de CD163 y una expresión moderada del marcador CD68. A continuación, se cuantificó en las células CD163+ la expresión relativa de fluorescencia de los marcadores asociados a un fenotipo M1 como CLEC5A, TNF α , EGLN3 y de los marcadores de tipo M2 FR β y CD209 (Puig-Kroger et al., 2009). Se cuantificaron más de 3000 células en varias muestras de pacientes con MM y los análisis revelaron que los MØ asociados a MM presentaron una alta expresión de los marcadores FR β y CD209 y por el contrario una baja expresión de CLEC5A, TNF α y EGLN3 (**Figura 17B**).

Por otro lado, se ha asociado la presencia del factor MIF con una activación alternativa de los MØ tumorales en modelos de melanoma (Reinart et al., 2013; Yaddanapudi et al., 2013). Asimismo, MIF se encuentra sobre-expresado en numerosos tipos de cáncer, y se ha correlacionado su grado de expresión con progresión tumoral y/o potencial metastático (Bando et al., 2002; Meyer-Siegler and Hudson, 1996; Xia et al., 2009). Por este motivo, quisimos evaluar la presencia de esta molécula en las muestras de MO de pacientes con MM y su análisis reveló una alta expresión de MIF junto con una alta expresión de CD74 en los MØ asociados a MM (**Figura 17A**). CD74 es el receptor de mayor afinidad de unión a MIF aunque también es conocido como cadena invariante del MHC de clase II (Leng et

al., 2003). En conjunto, estos datos mostraron que los MØ asociados a MM en pacientes con una elevada infiltración tumoral en la MO presentan un fenotipo M2 y sugieren a MIF como posible molécula que podría estar dirigiendo la activación alternativa de los MØ tumorales en el MM.

A



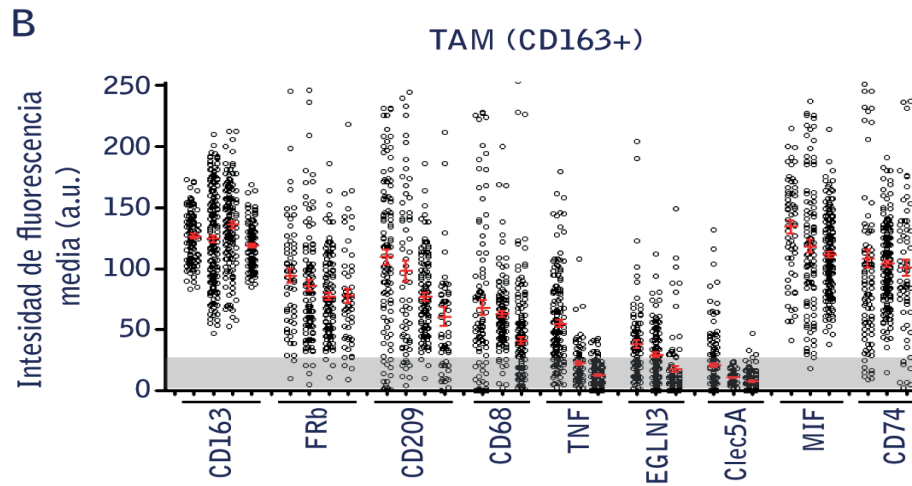


Figura 17. Análisis fenotípico de los TAMs en los grupos medulares de pacientes con MM. A. Se realizó análisis mediante marcaje multicolor de los marcadores CD68, FR β , CLEC5A, CD209, TNF α , EGLN3, CD74 y MIF en la población CD163+. Las imágenes superiores representan la vista panorámica de los grupos medulares, mientras que los paneles inferiores muestran imágenes en aumento. Los núcleos celulares aparecen en azul en todos los casos. B. Gráfica mostrando la intensidad media de fluorescencia para cada marcador en la población de TAMs CD163+ (n=10 casos). Las células que presentaban unidades arbitrarias (a.u.) > 25 se consideraron positivas, relativizadas al control negativo.

OBJETIVO 3

Diseño de estrategias destinadas al tratamiento del MM a través de la modificación fenotípica y funcional de los TAMs.

3. Repolarización *in vitro* de los MØ desde un fenotipo M2 pro-tumoral a un fenotipo M1 anti-tumoral mediante el uso de diferentes estrategias.

3.1 Uso de estrategias combinadas en la repolarización *in vitro* de los MØ-M pro-tumorales mediante el uso de un estímulo pro-M1 y el bloqueo de señales pro-M2.

105

La presencia de TAMs en muchos tipos de cáncer está relacionada con un mayor grado de progresión tumoral y por lo tanto con peor pronóstico (Komohara et al., 2008). Por consiguiente, se necesita de manera urgente el diseño de estrategias que regulen las vías causantes de la polarización de los MØ hacia un fenotipo pro-tumoral (Ruffell et al., 2012). Múltiples aproximaciones han sido diseñadas en varios modelos murinos de cáncer, bien para eliminar a la población de MØ del tumor o bien para inhibir las funciones pro-tumorales de éstos (Laoui et al., 2014). En este estudio se ha diseñado por primera vez como tratamiento en el MM una doble estrategia para reprogramar el MØ pro-tumoral hacia un MØ anti-tumoral, mediante el uso de una señal pro-M1 y el bloqueo de señales autocrinas/paracrinas que favorecen un fenotipo M2. En primer lugar, los MØ-M se sometieron a los diferentes estímulos, de forma aislada y en combinación, y se realizó un análisis de viabilidad celular en estas células (**Figura 18A**), mostrando que los agentes escogidos para llevar a cabo la repolarización no afectaban la viabilidad de los MØ-M. En el proceso de repolarización los MØ-M, previamente diferenciados (monocitos tratados durante 7 días con M-CSF), se sometieron a un protocolo de 3 dosis de reprogramación durante 7 días adicionales (ver esquema **Figura 18B**) y una vez finalizado se analizó la expresión génica y de proteína de varios marcadores M1/M2 así como la realización de ensayos funcionales. En la **Figura 18C** se puede ver como el tratamiento con GM-CSF induce en los MØ-M la expresión de los marcadores M1 *INHBA* y *EGLN3*, y una pequeña disminución en la expresión del gen de FRβ, *FOLR2*. El tratamiento de los MØ-M con GM-CSF en combinación con un bloqueo

de la señalización pro-M2 con el anticuerpo bloqueante de M-CSF o mediante el uso de inhibidores del receptor de M-CSF, CSF-1r (GW2580 y Ki20227), redujo los niveles de *FOLR2*, sin embargo, este doble tratamiento no contribuyó en el incremento de los niveles de *INHBA* y *EGLN3* inducido mediante el tratamiento sólo con GM-CSF, sino que incluso los redujo (**Figura 18C**) (Conway et al., 2005; Ohno et al., 2006).

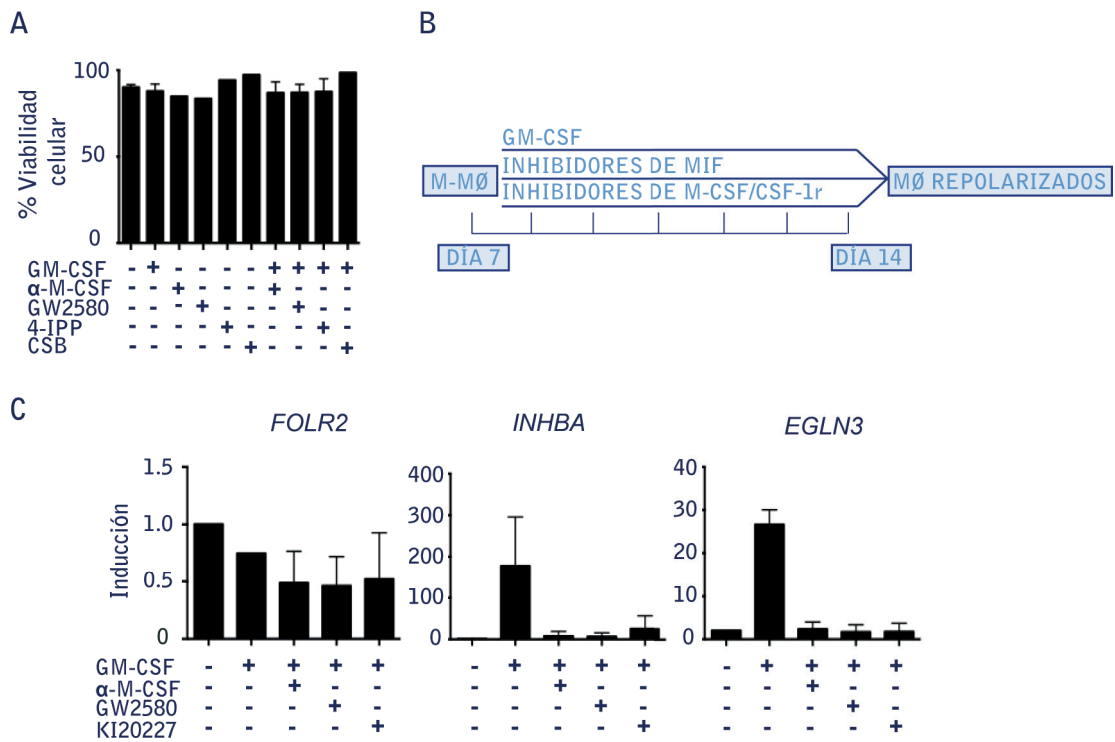
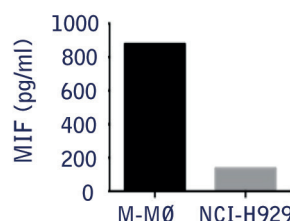


Figura 18. Repolarización del MØ-M pro-tumoral en anti-tumoral con GM-CSF en combinación con los inhibidores de M-CSF. **A.** Se muestra el porcentaje de viabilidad celular de los MØ-M, analizado por citometría de flujo tras su tratamiento con los diferentes estímulos utilizados en el estudio, como se indica en la figura. **B.** Representación del protocolo de repolarización llevado a cabo en los MØ-M. Los MØ-M a día 7 de diferenciación se estimularon durante 7 días adicionales con las diferentes estrategias de repolarización, que incluyeron el tratamiento con GM-CSF sólo o en combinación con los inhibidores de MIF (4-IPP y CSB), el anticuerpo neutralizante de M-CSF o el inhibidor de su receptor, GW2580. **C.** Niveles de expresión de *FOLR2*, *INHBA* y *EGLN3* medidos por PCR cuantitativa en MØ-M estimulados durante 24 horas con GM-CSF (1000 U/ml), anti-MCSF (5 µg/ml) o los inhibidores de su receptor CSF-1r GW2580 (1µM) y KI20227. Los valores en ausencia de tratamiento se les otorgó el valor arbitrario de 1.

Tal y como se ha mostrado previamente, los análisis realizados por microscopía confocal de MIF en las muestras de MO de pacientes con MM desvelaron que existen altas cantidades de este factor en el microambiente tumoral (**Figura 17A**). Posteriormente, se cuantificó la producción de MIF en los medios condicionados de los MØ-M y en la línea celular de MM NCI-H929 y se observó una alta producción de este factor por parte de ambos (**Figura 19**).



107

Figura 19. Niveles de MIF medidos por ELISA en los medios condicionados de los MØ-M y de las células NCI-H929.

Puesto que se ha descrito que MIF es capaz de controlar la activación alternativa de los MØ ([Yaddanapudi et al., 2013](#)), el siguiente paso fue bloquear la producción autocrina/paracrina de MIF por parte de los MØ-M mediante el inhibidor suicida 4-yodo-6-fenil pirimidina (4-IPP) (**Figura 20A**) ([Winner et al., 2008](#)). El uso únicamente del fármaco 4-IPP o de la citoquina GM-CSF por separado redujo significativamente los niveles de expresión de un panel de genes tipo M2 (*FOLR2*, *CD163*, *STAB1*, *SERPINB2* y *CCL2*), los cuales se vieron disminuidos en mayor medida cuando se combinaron ambos tratamientos. Además, el doble tratamiento GM-CSF+4-IPP cooperó en la inducción producida por el tratamiento único con GM-CSF en los genes M1 *INHBA*, *EGLN3* e *ICAM3*.

Con el fin de averiguar si el efecto observado mediante el uso del inhibidor 4-IPP era específico de la inhibición de MIF se utilizó otro inhibidor de esta molécula, de naturaleza alostérica, llamado Chicago sky blue (CSB) ([Bai et al., 2012](#)) y también se procedió a su silenciamiento mediante el uso de un siARN para seguidamente estudiar la expresión génica de marcadores M1 y M2 (**Figura 20B,C**). Análisis mediante PCR cuantitativa mostraron resultados similares a los obtenidos mediante el uso del inhibidor 4-IPP. Tanto el silenciamiento de MIF como el uso de CSB disminuyeron los niveles de *FOLR2*, niveles que se redujeron en mayor medida cuando se utilizó el tratamiento combinado GM-CSF+CSB. Además, este

tratamiento combinado produjo un aumento significativo de expresión de los marcadores M1 *EGLN3* e *INHBA*. Estos resultados sugieren que la inhibición de MIF mediante el uso de diferentes aproximaciones produce en los MØ-M la disminución de marcadores M2 con un recíproco aumento en marcadores M1.

108

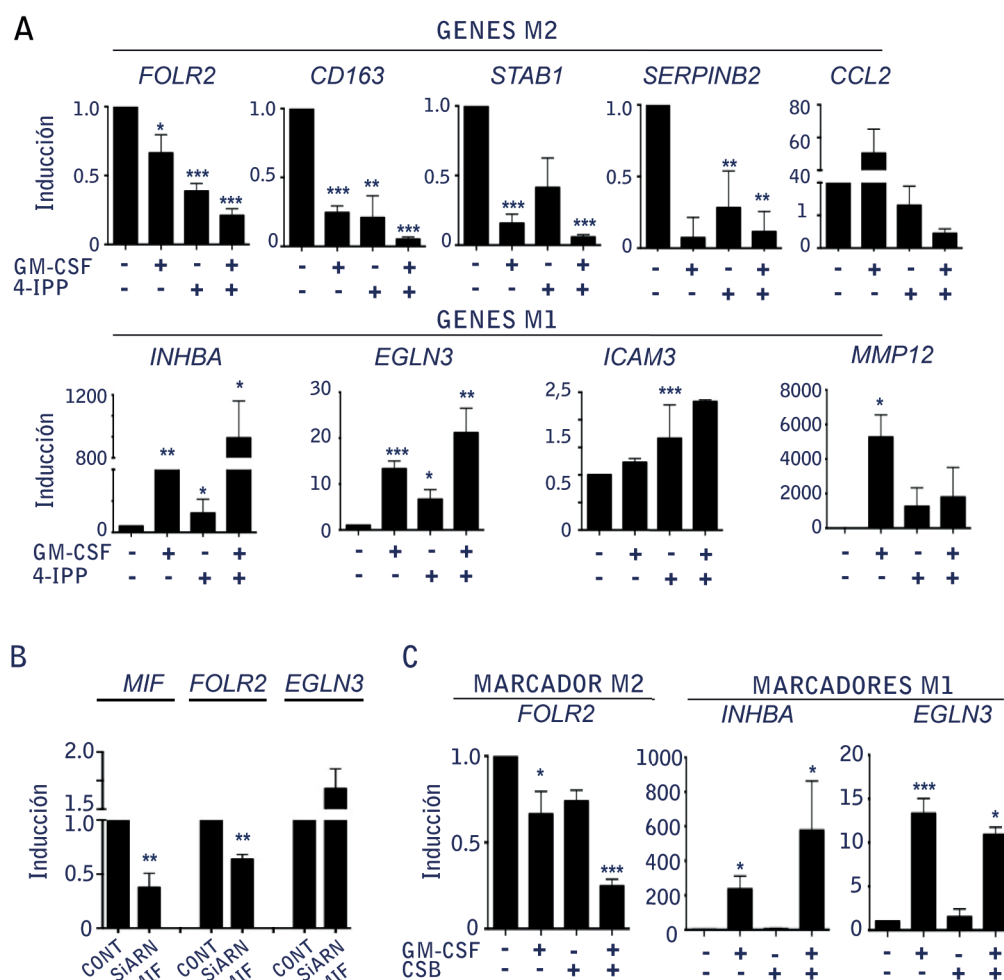
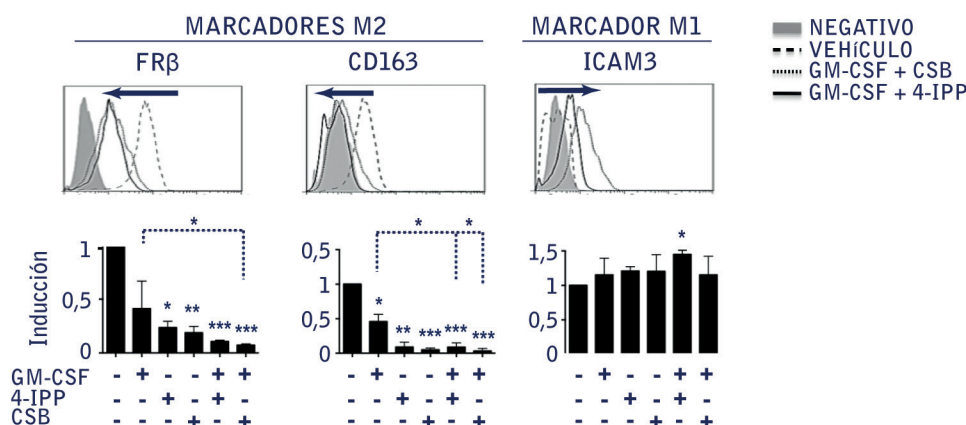


Figura 20. Expresión génica relativa de marcadores M1 y M2 en MØ-M tratados con GM-CSF e inhibidores de MIF o silenciados mediante siRNA. A. Niveles de expresión génica de *FOLR2*, *CD163*, *STAB1*, *SERPINB2*, *CCL2*, *INHBA*, *EGLN3*, *ICAM3* y *MMP12* medidos por PCR cuantitativa en los MØ-M tratados durante 24 horas con GM-CSF sólo o en combinación con el inhibidor de MIF 4-IPP (50 µM). Se muestra la media de al menos tres experimentos con diferentes donantes ±SEM (*, p<0.05; **, p<0.01, ***p<0.001). **B.** Niveles de expresión de *MIF*, *FOLR2* y *EGLN3* a las 72 horas en los MØ-M transfectados con el siARN de MIF o con un siARN control. Los resultados se expresan referidos al control en cada caso. **C.** Niveles de expresión de *FOLR2*, *INHBA* y *EGLN3* en MØ-M después de 24 horas de tratamiento con CSB (50nM) o en combinación con GM-CSF. Se representa la media de al menos tres experimentos con diferentes donantes ±SEM (*, p<0.05; **, p<0.01, ***p<0.001).

Por último, la doble combinación GM-CSF+4-IPP o GM-CSF+CSB fue lo suficientemente estable como para modificar el nivel de expresión de ciertas proteínas, disminuyendo significativamente los niveles de FR β y de CD163, marcadores asociados con un fenotipo M2, y aumentando los niveles de ICAM3 (**Figura 21**), marcador asociado a un fenotipo M1.



109

Figura 21. Expresión de membrana de marcadores M1 y M2 en los MØ-M repolarizados. Histogramas de citometría de flujo mostrando la expresión superficial de FR β , CD163 e ICAM-3 en los MØ-M sin tratamiento o tratados, como se indica en la figura. Se muestran los resultados de un donante representativo (gráficas superiores) y la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de al menos 4 experimentos independientes (gráficas inferiores). Los valores en ausencia de tratamiento se les ha dado el valor arbitrario de 1 (*, p<0.05; **, p<0.01, ***p<0.001).

3.2 Reprogramación *in vitro* de los MØ-M a nivel metabólico mediante la combinación de GM-CSF más 4-IPP.

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es un potente regulador de las vías de señalización inflamatorias en los MØ. Estímulos anti-inflamatorios como TGF- β o IL-10 inducen una fosforilación/activación de AMPK, mientras que estímulos pro-inflamatorios como LPS resultan en una defosforilación/inactivación de esta proteína (Sag et al., 2008). En base a esto nos propusimos analizar el nivel de activación de AMPK, mediante la detección de los cambios en la fosforilación del residuo T172 por “western blot”. El análisis de la expresión del epítipo fosforilado T172 de AMPK (activada) en los MØ-M mostró que el tratamiento tanto con GM-CSF como con 4-IPP disminuyó la fosforilación de AMPK y que esta reducción fue incluso mayor cuando se combinaron ambos tratamientos (**Figura 22**). Estos resultados indicaron que tanto el GM-CSF como el 4-IPP son capaces de disminuir la

actividad de AMPK en los MØ-M, sugiriendo que se está produciendo un cambio metabólico en estas células al ser reprogramadas con estos agentes y que el cambio es máximo con el tratamiento combinado.

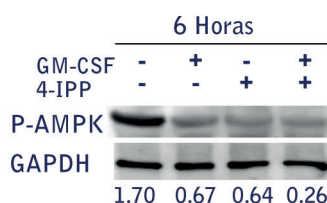


Figura 22. Expresión de P-AMPK en los MØ-M tratados con GM-CSF+4-IPP. Análisis por inmunoblot de la expresión de P-AMPK en MØ-M sin tratar o tratados durante 6 horas con GM-CSF, 4-IPP o la combinación de ambos. Se muestra la cuantificación de cada banda (números).

3.3 Ensayos funcionales de citotoxicidad de los MØ-M repolarizados en co-cultivo con las células de MM.

Por último quisimos comprobar si el proceso de repolarización de los MØ-M hacia un MØ de tipo M1, tanto a nivel génico como de proteína, también se producía a nivel funcional. Para ello, se realizaron experimentos de 72 horas de co-cultivo directo donde se añadieron las células de MM NCI-H929 o U266 a los MØ-M reprogramados mediante las diferentes estrategias diseñadas, para posteriormente analizar la muerte en la población de MM (**Figura 23 A, B y C**). Se observó un incremento significativo en la muerte de estas células tumorales mediante el co-cultivo con MØ-M repolarizados con la combinación de GM-CSF junto con la inhibición de la señalización autocrina/paracrina de MIF (4-IPP o CSB) o M-CSF. No obstante, el tratamiento de reprogramación de MØ-M con GM-CSF+4-IPP mostró los mayores efectos citotóxicos hacia las células de MM (**Figura 23 A-B**). En conjunto, estos datos mostraron que la combinación GM-CSF+4-IPP fue la estrategia más efectiva en cuanto a la repolarización de los MØ-M hacia un MØ de tipo M1, comprobado tanto a nivel génico, como de proteína, como a nivel de respuesta anti-tumoral. Además, estos resultados sugieren que una combinación de estímulos pro-M1 y anti-M2 pueden actuar de manera sinérgica para una repolarización más eficiente hacia un MØ de tipo M1 anti-tumoral.

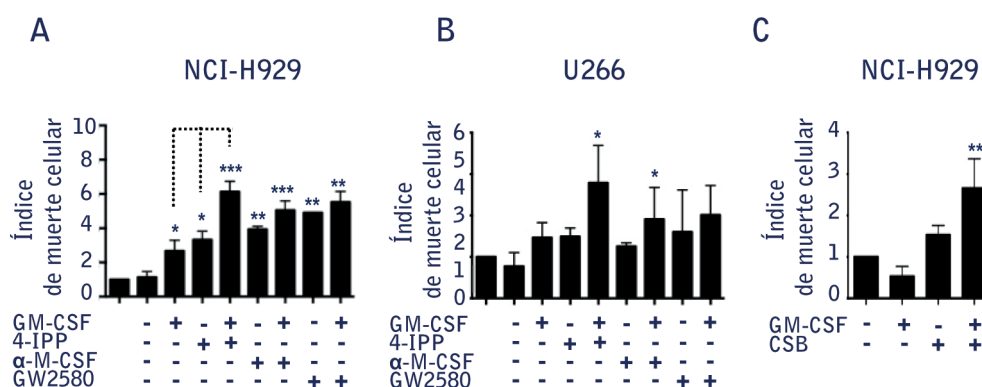


Figura 23. Ensayos funcionales de citotoxicidad de los MØ repolarizados con las células de MM. A-B. Determinación de la muerte celular en la línea celular NCI-H929 (A) y la línea U266 (B) cultivadas en presencia de MØ repolarizados con las diferentes estrategias, como se indica la figura. 4-IPP (50 μ M); CSB (50 nM); Anti-M-CSF (1 μ g/ml); GW2580 (1 μ M). C. Medida de la muerte celular en las células de MM (NCI-H929) en presencia de los MØ-M repolarizados con GM-CSF y CSB. Los resultados muestran la media de al menos tres experimentos independientes \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

111

Estos resultados además se confirmaron por vídeo-microscopía (**Figura 24**), en el cual se capturaron imágenes a intervalos de 10 minutos de las células de MM NCI-H929 en co-cultivo con MØ-M o con MØ-M repolarizados con el doble tratamiento GM-CSF+4-IPP. La Figura 24 muestra un aumento en el número de células apoptóticas en la población de MM en co-cultivo con los MØ-M tratados con GM-CSF+4-IPP (círculos amarillos) en comparación con los MØ-M en ausencia de tratamiento.

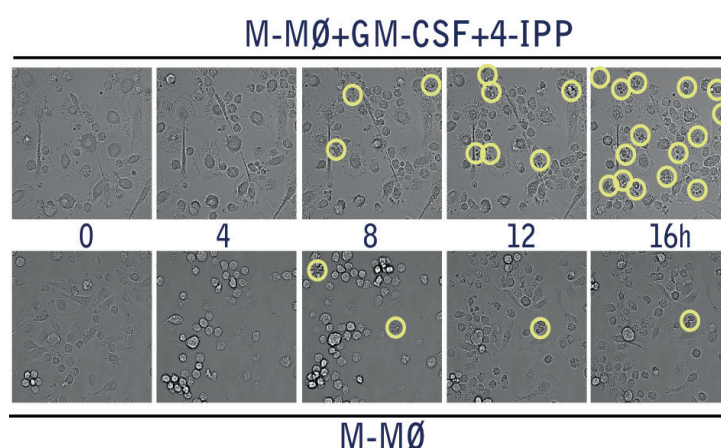


Figura 24. Video microscopía del MM con los MØ-M repolarizados. Las células NCI-H929 se pusieron en co-cultivo con los MØ-M tratados con GM-CSF+4-IPP o sin tratar (1:1) y se tomaron imágenes a intervalos de 10 minutos durante 16 horas. Se muestran las capturas a los tiempos 0, 4, 8, 12 y 16 horas. Los círculos amarillos corresponden a las células de MM muertas.

3.4. Estudio de los receptores involucrados en la polarización de los MØ a través de MIF.

3.4.1 Análisis de la expresión de los receptores de MIF en los MØ-M.

El primer receptor que se describió de MIF fue CD74, cadena invariante del receptor MHC de clase II y molécula de unión de alta afinidad a este factor (Leng et al., 2003). Más tarde, se ha visto que dependiendo de la función estudiada, MIF puede señalizar a través de la interacción de CD74 con la molécula CD44 o puede unirse directamente a los receptores de quimioquinas CXCR4, CXCR2 y CXCR7, pudiendo formar complejos de receptores de señalización entre ellos (Alampour-Rajabi et al., 2015; Klasen et al., 2014; Bernhagen et al., 2007). Con el fin de profundizar más en el papel que juega MIF en la polarización alternativa de los MØ, se examinó en primer lugar la expresión superficial e intracelular de los receptores CD74, CXCR4, CXCR7 y CXCR2 en los MØ-M mediante citometría de flujo. El análisis de estas moléculas mostró una alta expresión del receptor CXCR4 tanto a nivel de superficie como intracelular, mientras que CXCR7, CXCR2 y CD74 mostraron predominantemente una distribución en el interior de la célula (Figura 25).

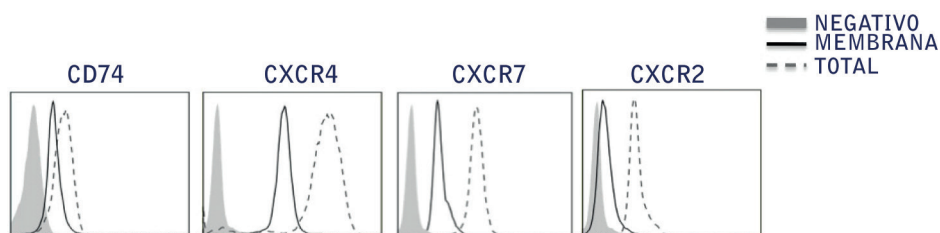


Figura 25. Expresión de los receptores de MIF en los MØ-M. Análisis realizado por citometría de flujo de la expresión de las moléculas CD74, CXCR4, CXCR7 y CXCR7 a nivel superficial e intracelular en los MØ-M. Se muestra un experimento representativo.

3.4.2 Estudio de los diferentes receptores de MIF en el proceso de repolarización de los MØ.

El siguiente paso fue comparar la capacidad de repolarización que mostraba el 4-IPP con los inhibidores o anticuerpos bloqueantes de los receptores de MIF, como el inhibidor de CXCR4 AMD3100, el inhibidor de CXCR7 CCXC733, el inhibidor de CXCR2 SB225002 y el anticuerpo neutralizante de CD74. Para ello, se estimuló a los MØ-M durante 24 horas con los diferentes agentes descritos, en ausencia o presencia de GM-CSF y se cuantificó por PCR cuantitativa la expresión relativa de los genes *FOLR2*, *INHBA* y *EGLN3*. Tanto el anticuerpo bloqueante de CD74 como el inhibidor CCXC733 mostraron una fuerte reducción del gen específico de M2 *FOLR2*, de manera muy similar a la producida por el 4-IPP, en el caso del anticuerpo CD74, y de manera más acusada con el inhibidor de CXCR7 (**Figura 26**). El uso de GM-CSF en combinación con el anticuerpo bloqueante de CD74 redujo aún más los niveles de *FOLR2*. Por otro lado, el bloqueo de CXCR2 y de CXCR4 fue menos efectivo en la disminución de *FOLR2*, no encontrándose respuesta con el uso del inhibidor AMD3100. En cuanto al impacto causado en los genes específicos M1, el uso del anti-CD74 o de 4-IPP únicamente afectó los niveles de *EGLN3* y ni estos inhibidores ni el CCXC733 fueron capaces de aumentar la expresión de la *INHBA*, gen altamente dependiente de la señalización por GM-CSF. De forma marcada, la combinación de 4-IPP, del anti-CD74 o de CCXC733 junto con GM-CSF, aumentó los niveles de expresión tanto de *INHBA* como de *EGLN3* en comparación con la inducción producida por el GM-CSF sólo. Esto puede sugerir que MIF señala preferentemente a través de sus receptores CD74 y de CXCR7 en el proceso de polarización de los MØ.

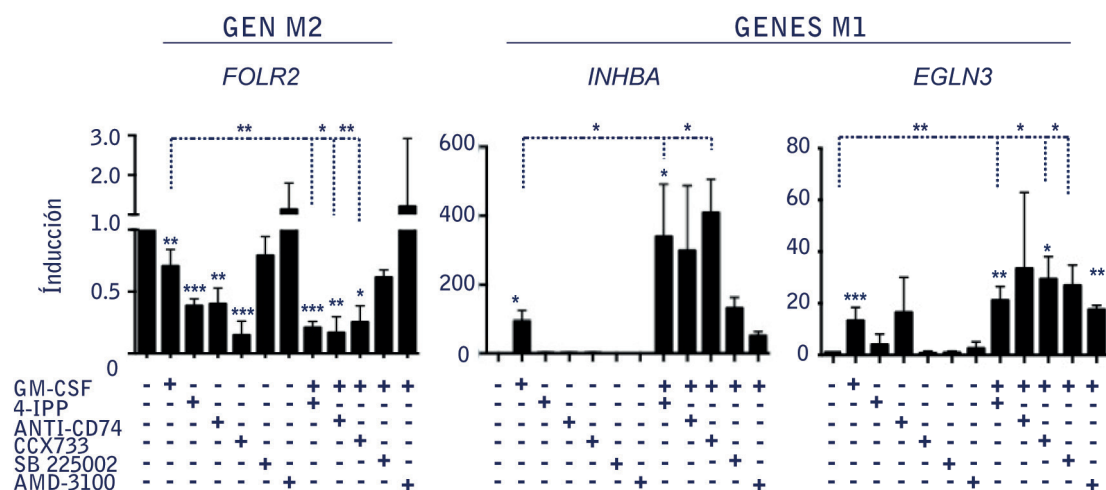


Figura 26. Señalización de MIF en el proceso de repolarización. Niveles de expresión de *FOLR2*, *INHBA* y *EGLN3* determinado por PCR cuantitativa en los MØ-M tratados durante 24 horas con GM-CSF (1000 U/ml); 4-IPP (50 μ M); AMD3100 (25 μ g/ml); CCX733 (100 nM); SB225002 (300 nM) y el anticuerpo bloqueante anti-CD74, o GM-CSF en combinación con todos ellos. Los valores en ausencia de tratamiento se les ha dado el valor arbitrario de 1. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

OBJETIVO 4

Estudio del efecto terapéutico de los tratamientos diseñados en modelos de ratón xenotransplantados con células de MM.

4. Análisis *in vivo* del efecto de la repolarización del MØ en modelos de MM en ratón.

4.1 Eficacia terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP en modelos de ratón xenotransplantados subcutáneamente con células de MM.

Los análisis realizados por microscopía confocal revelaron que MIF se expresaba de manera abundante en las muestras de MO de pacientes con MM. Por otro lado, los estudios llevados a cabo de repolarización *in vitro* establecieron que el tratamiento más efectivo era la combinación de GM-CSF junto con el inhibidor de MIF 4-IPP. Por consiguiente, se decidió evaluar el potencial terapéutico de esta combinación en la repolarización de los MØ en varios modelos xenotransplantados de MM. Previamente, se confirmó que tanto los MØ-M como los MØ-GM derivados *in vitro* provenientes de ratones NSG se comportaban de la misma manera que los MØ humanos cuando se encontraban en co-cultivo con las células de MM. Asimismo, también se comprobó la naturaleza citotóxica de estos MØ-M murinos al ser repolarizados con la doble combinación GM-CSF+4-IPP (**Figura 27**).

119

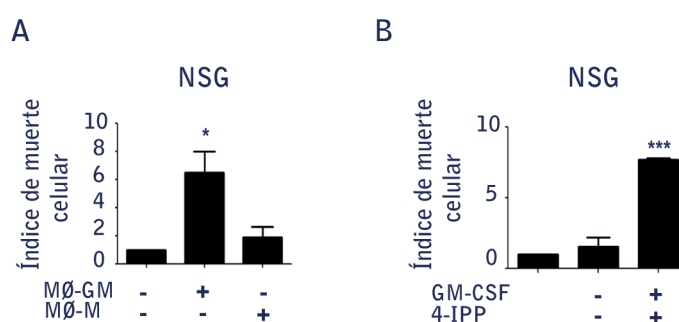


Figura 27. Co-cultivo de las células NCI-H929 en presencia de MØ-GM, MØ-M o MØ-M repolarizados de ratones NSG. Las células de MM se pusieron en co-cultivo con los MØ-GM y MØ-M de ratones NSG o en co-cultivo con MØ-M murinos repolarizados con el doble tratamiento GM-CSF+4-IPP. Se analizó la muerte celular en las células de MM a los tres días. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

El primer modelo utilizado con el fin de estudiar la eficacia terapéutica del doble tratamiento fue un modelo murino en el que las células NCI-H929 se inyectaron subcutáneamente (s.c) en el flanco de ratones inmunodeficientes NSG (carentes de los linajes B, T y NK) y SCID (carentes de los linajes B y T). Este sistema de inyección subcutánea se utilizó ya que permitía el seguimiento del crecimiento tumoral así como la purificación de los TAMs una vez extraídos los tumores. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100mm³, los ratones se trataron cada dos días con la combinación GM-CSF+4-IPP, con el vehículo o únicamente con 4-IPP. Se obtuvieron reducciones significativas del volumen tumoral en ambos modelos de ratón, NSG y SCID, cuando se trataron con la doble combinación GM-CSF+4-IPP en comparación con el vehículo o con el tratamiento único con 4-IPP (**Figura 28**).

120

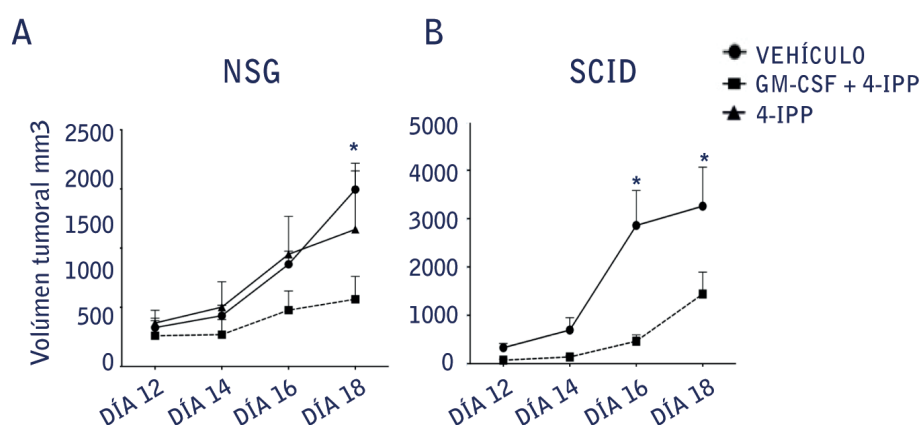


Figura 28. Efecto terapéutico del tratamiento GM-CSF+4-IPP en un modelo subcutáneo de MM en ratón. A-B. Las células NCI-H929 (3×10^6) se inyectaron s.c en el flanco de ratones NSG (gráfica de la izquierda) o en ratones SCID (gráfica de la derecha). Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100mm³ los ratones se trataron con GM-CSF+4-IPP, con el vehículo o únicamente con 4-IPP cada dos días antes de su sacrificio (día 18). En las gráficas se muestra la media del volumen tumoral de n=6-10 ratones (gráfica de la izquierda) y de n=8 (gráfica de la derecha) por cada condición \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

4.2 Estudio *in vivo* de la contribución del MØ en la respuesta terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP.

Para evaluar la contribución específica que desempeñaban los MØ en la reducción tumoral de los ratones tratados con la combinación GM-CSF+4-IPP se usaron liposomas de clodronato, vesículas lipídicas sintéticas que ocasionan una depleción de la población de MØ *in vivo* en modelos animales. Estos liposomas llevan encapsuladas en su interior las moléculas de clodronato, las cuales al ser hidrofílicas, nunca podrían atravesar por sí mismas la membrana lipídica. Puesto que los MØ son células altamente fagocíticas, éstos ingieren las vesículas lipídicas, lo que conlleva la liberación en su interior de las moléculas de clodronato que al alcanzar una determinada concentración intracelular induce la apoptosis de los MØ (van Rooijen et al., 1996).

121

Las células NCI-H929 se inyectaron en el flanco de ratones NSG y se procedió a la inyección intravenosa (i.v) de los liposomas de clodronato una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 100mm³, ya que los tumores no se desarrollan si los liposomas se inyectan a la vez que las células de MM, debido a la importancia del MØ en la iniciación tumoral. Después de 48 horas de la depleción de los MØ, se comenzó el tratamiento con GM-CSF+4-IPP, tanto en los ratones tratados con clodronato como en los no tratados. En la **Figura 29** se observa como en los ratones tratados con GM-CSF+4-IPP el volumen tumoral disminuye en comparación con los ratones tratados con GM-CSF+4-IPP y clodronato. Estos resultados indicaron que la presencia de los MØ es necesaria para

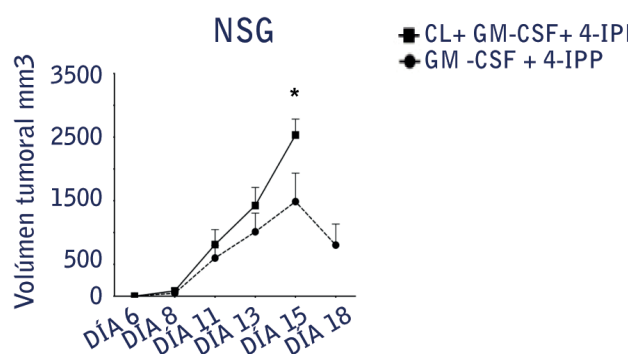


Figura 29. Efecto de la combinación GM-CSF+4-IPP en ratones tratados con liposomas de clodronato. Una vez que los tumores xenotransplantados en ratones NSG alcanzaron 100mm³ se inyectaron por vía i.v los liposomas de clodronato, dos días después se inició el tratamiento con la combinación GM-CSF+4-IPP cada dos días. En la gráfica se muestran las dimensiones del volumen tumoral (mm³) y se representa la media del volumen tumoral de 5 ratones por cada grupo \pm SEM (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.3 Análisis de marcadores asociados a polaridad M1/M2 en la población de TAMs aislados de tumores de MM tratados con GM-CSF+4-IPP.

Con el fin de comprobar si el tratamiento combinado aplicado en los ratones estaba ejerciendo un efecto sobre la polarización de los TAMs murinos diferenciados *in vivo*, procedimos al aislamiento de la población mieloide asociada a tumor mediante el uso de bolas magnéticas Cd11b. Seguidamente se procedió a la extracción de su ARN y cuantificación mediante PCR cuantitativa de la expresión relativa de un panel de genes murinos de polarización de MØ M1 (*Cd11c*, *Inos*, *Inhba*, *Egln3*, *Ccr7*, *Aldh2* y *Ccr2*) y M2 (*Stab1*, *Gas6*, *Ctla2b*, *Cd206*, *Il-10*, *Mgl-1*, *Hpdg* y *Slpr1*). Estos análisis revelaron una reducción general de los marcadores de tipo M2 en los ratones tratados con GM-CSF+4-IPP, que resultó estadísticamente significativa en el caso de los genes *Cd206*, *Slpr1*, *Stab1* y *Ctla2b* (**Figura 30**). La disminución en la expresión de los genes M2 se acompañó de un aumento recíproco del nivel de expresión de los genes M1, de manera significativa en los genes de la *Inhba* y de *Ccr2*. Estos resultados indicaron que el tratamiento con GM-CSF+4-IPP promovió un cambio en la expresión génica *in vivo* de los TAMs asociados a MM, generando una población de MØ con características anti-tumorales.

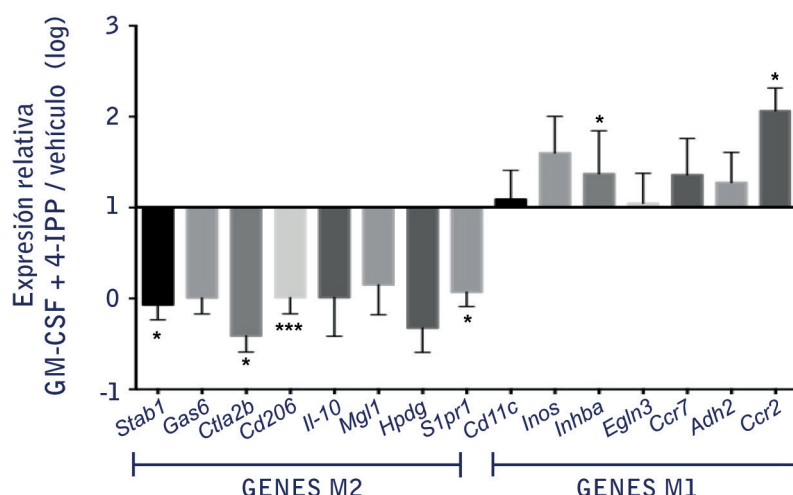


Figura 30. Estudio del perfil de expresión de genes M1/M2 en la población de TAMs murinos tratados con GM-CSF+4-IPP. Expresión de marcadores de polarización M1 y M2 medido por PCR cuantitativa en células Cd11b+ aisladas de tumores de MM xenotransplantados en ratones NSG tratados con GM-CSF+4-IPP en comparación con ratones control (n=10 en cada grupo). Se muestra la expresión relativa (escala logarítmica) indicando la expresión de cada marcador después del tratamiento con GM-CSF+4-IPP relativo a la expresión en ausencia de tratamiento (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.4 Eficacia terapéutica del tratamiento con GM-CSF+4-IPP en modelos de ratón xenotransplantados intravenosamente con células de MM.

En un segundo modelo de la enfermedad las células MM.1S-GFP se inyectaron por la vena de la cola de ratones NSG (NOD/SCID gamma). Pasados 10 días, los ratones se trataron con GM-CSF+4-IPP o con el vehículo. Después de dos semanas se cuantificó mediante citometría de flujo la infiltración de células MM.1S-GFP en la médula ósea de los ratones, midiendo la expresión simultánea de GFP y de HLA-1, así como la expresión a nivel de ARNm de la proteína GAPDH humana (**Figura 31 A-B**).

El doble tratamiento GM-CSF+4-IPP en comparación con el vehículo redujo la infiltración de las células MM.1S-GFP en la MO (**Figura 31 A-B**). Por otra parte, aunque las células de MM también expresan receptores de MIF, como CD74 y CXCR4 (Stein et al., 2004), la reducción en el volumen tumoral no pareció deberse a una toxicidad causada sobre las propias células de MM, ya que nuestros experimentos realizados *in vitro* demostraron que el 4-IPP no afectaba su viabilidad (**Figura 31C**).

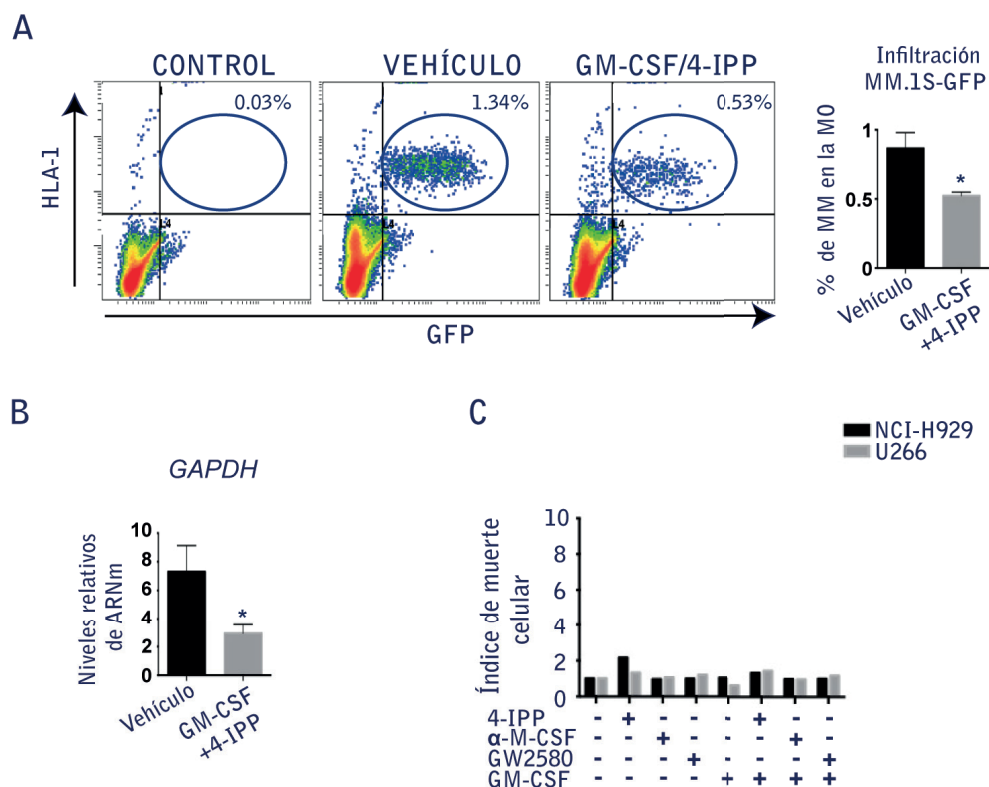


Figura 31. Efecto terapéutico del tratamiento GM-CSF+4-IPP en un modelo sistémico de MM en ratones NSG. A-B. Las células MM.1S-GFP (5×10^6) se inyectaron por la vena de la cola en ratones NSG y a los 10 días se comenzó el tratamiento con GM-CSF+4-IPP o con el vehículo. Pasadas dos semanas del tratamiento se analizó la infiltración de MM en la MO mediante citometría de flujo midiendo la expresión de GFP y HLA-1 (A). Se presentan dot-plots representativos mostrando el porcentaje de infiltración en cada caso (izquierda) y la cuantificación $n=14 \pm \text{SEM}$ (derecha). (B) Se analizó por PCR cuantitativa la expresión de *GAPDH* humana en las muestras de MO de ratones tratados con la combinación GM-CSF+4-IPP o con el vehículo. C. Se representa la muerte celular en las líneas NCI-H929 y U266 tratadas con 4-IPP, anti-M-CSF, GW2580 y GM-CSF de forma aislada o en combinación con este último.

4.5 Análisis de marcadores de polaridad M1/M2 en la población de macrófagos presentes en médula ósea.

Por último, se quiso comprobar si el tratamiento GM-CSF+4-IPP ejercía un efecto sobre la polaridad de los MØ presentes en la MO de los ratones infiltrados con las células de MM. El análisis de un amplio panel de genes de polaridad M1/M2 reveló, de la misma manera que en el modelo subcutáneo, un aumento en los marcadores de genes M1 (*Inos*, *Inhba*, *Egln3*, *Ccr7*, *Tnf* y *Aldh2*) y una disminución de los genes M2 (*Stab1*, *Ctla2b*, *Mgl-1*, *Cd163* y *Slpr1*) (Figura 32). Estos resultados confirmaron la capacidad de repolarización *in vivo* del doble tratamiento GM-CSF+4-IPP.

125

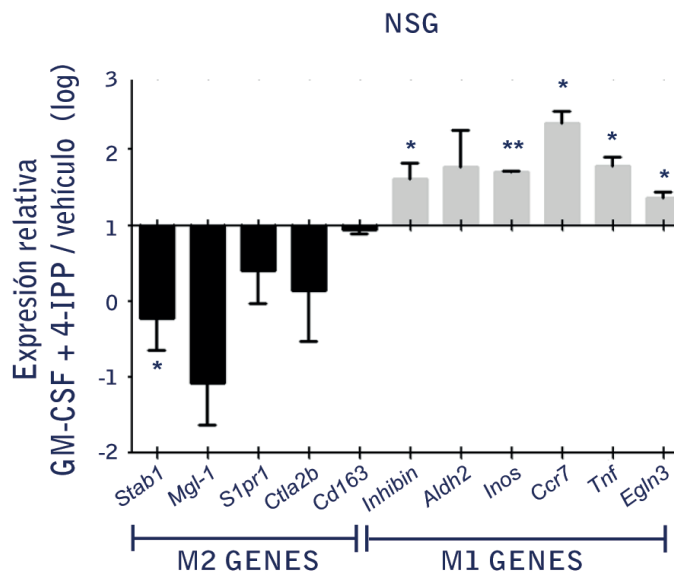


Figura 32. Estudio del perfil de expresión de genes M1/M2 en la población de TAMs murinos tratados con GM-CSF+4-IPP en comparación con el vehículo. Expresión de marcadores de polarización M1 y M2 medido por PCR cuantitativa en células de MO procedentes de ratones NSG con infiltración medular de MM y tratados con GM-CSF+4-IPP en comparación con ratones control (n=10 en cada grupo). Se muestra la expresión relativa (escala logarítmica) indicando la expresión de cada marcador después del tratamiento con GM-CSF+4-IPP relativo a la expresión en ausencia de tratamiento (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$, *** $p<0.001$).

DISCUSIÓN

El MM sigue siendo una enfermedad incurable principalmente debido a la existencia de la enfermedad mínima residual (EMR), que hace referencia a la persistencia de una pequeña cantidad de células tumorales tras el tratamiento, y que es normalmente apoyada por el microambiente de la MO derivando en los fenómenos de resistencia a drogas y en la recaída de la enfermedad (Bianchi and Munshi, 2015). Por este motivo se necesitan de manera urgente nuevas estrategias dirigidas hacia la supresión del soporte que proporciona el microambiente tumoral, con el fin de incrementar la eficacia de las terapias convencionales destinadas al tratamiento de las células tumorales. En este sentido, los TAMs representan un componente muy abundante y crucial del microambiente tumoral, que contribuye a la falta de respuesta de las células tumorales frente a tratamientos citotóxicos como la quimioterapia (Solinas et al., 2009). Sin embargo, la función y el fenotipo de los MØ es muy maleable, de manera que en las condiciones adecuadas pueden llegar a adquirir potentes propiedades anti-tumorales, como es el caso de las células de kupffer, capaces de matar a células tumorales circulantes o el papel que desempeñan los MØ en la MO fagocitando las células que no presentan en su superficie la señal protectora “no me comas” CD47 (Heuff et al., 1993; Jaiswal et al., 2009; Long and Beatty, 2013). En el MM, las células tumorales fallan frecuentemente en su respuesta a los tratamientos habituales debido a la fuerte interacción existente con la población de MØ presente en la MO (Zheng et al., 2013). En este trabajo se ha evaluado el valor terapéutico de la reprogramación de los MØ en el MM con el fin de obtener un fenotipo anti-tumoral capaz de desencadenar una respuesta citotóxica contra las células de MM.

Mediante microscopía confocal se ha mostrado una elevada expresión de la citoquina MIF en la población de MØ presentes en el microambiente medular de pacientes con un estado de MM activo, con un papel autocrino muy importante en la polarización del MØ hacia un fenotipo M2, principalmente a través de los receptores CD74 y CXCR7. Por medio de un tratamiento combinado, que comprende por un lado un estímulo pro-M1 mediante el uso de la citoquina GM-CSF, y por otro lado, el bloqueo de la señalización pro-M2 usando el inhibidor de MIF 4-IPP, se ha incrementado la expresión de marcadores M1 con una recíproca disminución en los marcadores de tipo M2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta estrategia combinada promovió la reducción de los tumores de MM inducidos en ratones

xenotransplantados y permitió identificar a los MØ como prometedoras dianas terapéuticas, ya que una depleción de los MØ mediante el uso de liposomas de clodronato anuló el beneficio terapéutico del tratamiento. Nuestros datos establecen el potencial papel traslacional que puede tener el uso de tratamientos combinados que promuevan por un lado un fenotipo M1 y que bloqueen por otro la señalización M2, para lograr una completa reprogramación de los TAMs en el MM.

130 Previamente se han descrito en nuestro laboratorio marcadores de polarización M1 y M2 mediante microscopía confocal de MØ tisulares en diversas patologías humanas como en enfermedades inflamatorias intestinales o en procesos tumorales como melanomas primarios y metastáticos (Gonzalez-Dominguez et al., 2015). Se realizaron análisis cuantitativos de imagen de muestras de MO de pacientes con una alta infiltración de CPs y éstos revelaron que los TAMs asociados a MM presentan de manera predominante un fenotipo M2, con una alta expresión de los marcadores CD163, CD209 y FR β , una baja expresión de los marcadores CLEC5A, TNF α , EGLN3 y moderada expresión de CD68.

En la mayoría de tipos de cáncer existe un diverso espectro de poblaciones de MØ durante la evolución del tumor, que promueve su asentamiento, progresión, y que en algunos casos, finaliza en metástasis (Lewis and Pollard, 2006). Existe un creciente reconocimiento que un proceso inflamatorio es la raíz y el origen de muchos tipos de cáncer (Qian and Pollard, 2010). En este sentido, se ha descrito en varios procesos cancerígenos la existencia de un ambiente inflamatorio durante el inicio del tumor que promueve el crecimiento tumoral y que conforme éste avanza los MØ van adquiriendo características pro-tumorales de tipo M2, estimulando la angiogénesis, inmunosupresión, migración e invasión (Qian and Pollard, 2010). En el MM se ha visto que ocurre este proceso, ya que en diagnósticos tempranos de la enfermedad se ha mostrado que los monocitos/MØ del microambiente tumoral presentan un fenotipo transcripcional pro-inflamatorio, expresando citoquinas como IL-1 β , TNF α , o IL-6, pero que durante la progresión tumoral se produce un cambio en el fenotipo hacia un MØ de tipo M2 en modelos murinos de MM, con una disminución en la expresión del marcador M1 de ratón *iNos* y un aumento en la expresión del marcador M2 *Arginina-1*, lo que es consistente con nuestros resultados (Hope et al., 2014; Kim et al., 2012b). De hecho, recientemente se han

encontrado altos niveles de las formas solubles de los marcadores asociados a un fenotipo pro-tumoral M2 CD163 y CD206 (receptor de manosa) en el suero de pacientes con MM, pudiéndose establecer como marcadores independientes de supervivencia en esta enfermedad y suministrar información acerca de la activación alternativa de los MØ en el MM (Andersen et al., 2014; Andersen et al., 2015). Es más, resultados previos en el laboratorio mostraron que los MØ-M diferenciados *in vitro* presentan un perfil génico similar a los TAMs aislados de manera *ex vivo* de diversos tipos de tumores, lo que apoya el uso de este tipo de MØ-M como una aproximación *in vitro* de TAM adecuada para explorar los protocolos de repolarización (Soler Palacios et al., 2015).

131

En este trabajo se han explorado factores implicados en el control de la activación alternativa de los MØ, como M-CSF y MIF. La citoquina M-CSF que tiene un papel esencial en el desarrollo y la supervivencia de los MØ, tiene además un papel importante en la polarización de los MØ que emerge a partir de la observación de que poblaciones de MØ diferenciadas principalmente en presencia de M-CSF expresan de manera sustancial el transcriptoma M2 (Martinez et al., 2006). Además, se encuentra sobre-expresada en estadios avanzados de muchos tipos de cáncer, pudiéndose incluso detectar a nivel sistémico cuando los niveles son muy elevados (Laoui et al., 2014). Existen múltiples estudios en los que se correlacionan de manera positiva parámetros clínicos del paciente, como son estadios tumorales avanzados y baja supervivencia, con altos niveles de M-CSF, tanto de expresión de ARN como de proteína, y que a su vez se correlacionan con una alta infiltración de TAMs (Kluger et al., 2004).

Por otro lado, MIF ha sido descrito como un factor capaz de controlar la activación alternativa de los MØ en el microambiente tumoral (Yaddanapudi et al., 2013). MIF se seleccionó en nuestro estudio por su abundante expresión por parte de las células primarias provenientes de pacientes con MM (Claudio et al., 2002). Asimismo, análisis cuantitativos de imagen realizados en muestras de MO de pacientes con un estado de MM activo nos permitieron detectar altos niveles de MIF en el microambiente medular, junto con una alta expresión de su receptor de alta afinidad CD74.

Aunque MIF se identificó en un principio como una citoquina pro-inflamatoria, los estudios más recientes indican que se trata de una citoquina pleiotrópica con una compleja

señalización dependiente del contexto donde se encuentre, presentando un papel importante particularmente en carcinogénesis (Mitchell and Bucala, 2000; Richard et al., 2015). En la actualidad, se están explorando múltiples estrategias dirigidas hacia el bloqueo de MIF con un objetivo terapéutico en patologías relacionadas en mayor medida con la inflamación, aunque también se ha observado como su inhibición en cáncer puede proporcionar beneficios clínicos (Richard et al., 2015). Una de las múltiples funciones de MIF es controlar la proliferación y supervivencia de las células B maduras, por esta razón el anticuerpo monoclonal bloqueante de su receptor de alta afinidad CD74 “milatuzumab” está siendo evaluado clínicamente en la actualidad como tratamiento de esta patología (Mark et al., 2009; Starlets et al., 2006). Por lo tanto, un bloqueo de MIF o de sus receptores puede hacer diana sobre ambas poblaciones, los MØ presentes en el microambiente de la MO y las células tumorales de MM. En este sentido es necesario estudiar en profundidad el efecto que los inhibidores de MIF puedan ejercer sobre las propias células tumorales. El reconocimiento del importante papel del microambiente medular en la progresión del MM ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos hacia el tratamiento tanto de las células tumorales como de su microambiente, con el fin de vencer el fenómeno de resistencia a drogas y mejorar el pronóstico del paciente (Bianchi and Munshi, 2015). La introducción de nuevas drogas como las llamadas inmunomoduladoras lenalidomida o talidomida, que inducen citotoxicidad no sólo en las células tumorales sino que modulan diferentes componentes del sistema inmune, como la alteración en la producción de citoquinas y la estimulación de células T o NK, han mejorado de manera considerable la evolución clínica de pacientes con MM (Rajkumar et al., 2002; Richardson et al., 2003). Otra droga que ha supuesto un gran beneficio en los pacientes de MM ha sido el bortezomib el cual se ha visto como puede mediar procesos anti-angiogénicos a través de mecanismos directos e indirectos sobre las células endoteliales (Anderson, 2007; Roccaro et al., 2006).

Nuestro principal objetivo se centró en reprogramar los MØ pro-tumorales de tipo M2 en MØ de tipo M1 con capacidades anti-tumorales. Para ello, primero se analizó el papel citotóxico o protector de varios estados de polarización de MØ sobre las células de MM. Experimentos de co-cultivo de contacto celular directo entre los MØ y las células tumorales revelaron que los MØ-GM, y en mayor medida los MØ LPS/IFN γ , indujeron la muerte de

manera significativa de las células tumorales de MM. Por otro lado, tanto los MØ-M como los MØ-IL4 no produjeron este efecto, sino que incluso los MØ-M protegieron a estas células tumorales de una muerte inducida por bortezomib. La diferencia de comportamiento entre ambos tipos de MØ-GM y MØ-M se corroboró en modelos xenotransplantados de MM donde los MØ-GM limitaron el crecimiento tumoral *in vivo* y los MØ-M por el contrario lo estimularon. Adicionalmente, análisis realizados mediante video microscopía mostraron que los MØ-GM son capaces de inducir dos tipos diferentes de muerte programada en las células de MM, necrótica y apoptótica. Estos resultados sugieren que la diferenciación del MØ únicamente en presencia de GM-CSF es suficiente para desencadenar un efecto citotóxico significativo sobre las células de MM. Esta capacidad se observó hace varias décadas al estimular a monocitos procedentes de sangre periférica con dicha citoquina y observar que estas células se volvían citotóxicas para las células tumorales de melanoma A375 (Grabstein et al., 1986). Una estimulación adicional mediante el uso de LPS e IFN γ produce una respuesta citotóxica aún mayor sobre las células de MM, ya que se genera una activación mayor del MØ, sin embargo, el derivado bacteriano LPS actúa como una endotoxina en el organismo, provocando múltiples efectos patológicos en humanos (Liu and Bing, 2011; Schletter et al., 1995). En cuanto al IFN γ , a pesar de la existencia de un gran número de evidencias acerca de su importante implicación en la respuesta inmune anti-tumoral, ha habido un enorme flujo de estudios en los que se ha visto que puede desempeñar efectos pro-tumorales, ejerciendo un papel dual dependiendo del contexto en el que se encuentre, al igual que se ha visto con otras citoquinas como TNF α o TGF β . Es más, su uso en ensayos clínicos de melanoma ha revelado resultados no concluyentes y en algunos casos incluso efectos secundarios graves (Zaidi and Merlino, 2011). Por otro lado, el tratamiento con GM-CSF ha sido evaluado recientemente en pacientes de melanoma de alto riesgo y los resultados sugieren que su uso puede tener un efecto beneficioso en esta enfermedad (Lawson et al., 2015a).

Con el fin de inhibir la muerte dependiente de contacto celular entre los MØ-GM y las células de MM, se usó el sistema de co-cultivo en transwell así como el cultivo de las células de MM exclusivamente en presencia de los medios condicionados de los MØ. Aún en ausencia de contacto celular, los MØ-GM, y de manera incrementada los MØ-LPS/IFN γ ,

fueron capaces de inducir la muerte de las líneas celulares NCI-H929 y U266, tanto en el cultivo en transwell como únicamente en presencia de los sobrenadantes. Estos resultados sugieren que los MØ de tipo M1 son capaces de inducir la muerte de manera significativa en las células de MM de forma tanto dependiente como independiente de contacto celular, en esta última a través de la secreción al medio de moléculas solubles de naturaleza citotóxica. En los co-cultivos directos los MØ-GM promovieron la muerte del MM de manera más rápida y sostenida que en ausencia de contacto célula-célula, esto puede ser debido a que en este tipo de co-cultivos existen por un lado mecanismos de inducción de muerte directa, mediante el reconocimiento, unión e inducción de lisis en la célula tumoral o mediante el proceso de muerte por fagocitosis, y por otro lado, a la síntesis y liberación de moléculas solubles que actúan como mediadores citotóxicos no dependientes de contacto celular como proteasas, ROS, NOS, activina o TNF α , todas estas vías colaboran en la generación de un proceso de inducción de muerte más completo, rápido y eficaz ([Klimp et al., 2002](#); [Laskin et al., 2011](#)). En relación a las moléculas secretadas por los MØ capaces de inducir la muerte en las células tumorales, el TNF α parece ser el principal mediador de este proceso ([Urban et al., 1986](#)). TNF α se considera como uno de los reguladores críticos de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, liberado en mayor medida por los MØ tras su activación en respuesta a ligandos TLR, como LPS ([Mosser and Edwards, 2008](#)). Por otro lado, otra molécula secretada predominantemente por las células presentadoras de antígenos que ha emergido como potente mediador anti-tumoral es la citoquina IL-12 ([Tugues et al., 2015](#)). La implicación de estas moléculas como posibles citoquinas mediadoras de la muerte inducida en el MM por parte de los MØ salió a relucir cuando observamos su producción en los sobrenadantes procedentes de los co-cultivos MØ-GM+MM, ya que ni las líneas celulares de MM ni los MØ-GM cultivados de manera aislada producían estos factores. Por lo tanto, estos resultados sugieren que un proceso de cross-activación podría estar ocurriendo entre las células de MM y los MØ-GM, en el cual existen interacciones entre ambos tipos celulares, mediante señales bidireccionales que llevan como consecuencia la liberación de TNF α y de IL-12 al medio.

En la actualidad el factor TNF α es objeto de gran controversia respecto al papel que realiza en la progresión de los procesos tumorales, pudiendo ejercer un papel dual incluso dentro del mismo tipo de cáncer. Existen estudios que han reportado el efecto apoptótico que desempeña el factor TNF α y de otros miembros de su familia, como TRAIL/apo2, sobre las células de MM, no obstante, también se ha descrito como factor inductor de supervivencia y proliferación en esta patología (Gazitt et al., 1999; Jourdan et al., 1999; Labrinidis et al., 2009). Esta función dual del TNF α parece residir en uno de los desencadenantes finales de su vía de señalización, el factor de transcripción NFKB, cuyo nivel de actividad es determinante para el destino de la célula, ya que su activación conduce a la supresión de la apoptosis pero su inactivación y/o ausencia induciría la muerte de la célula (Karin and Lin, 2002). El uso del anticuerpo bloqueante de TNF α infliximab únicamente logró disminuir la muerte de la línea de MM sensible a TNF α NCI-H929, cultivada en presencia del sobrenadante rico en TNF α proveniente del co-cultivo MØ-GM+MM, pero no de la línea resistente U266, cuya muerte sólo se vio revertida cuando se cultivó en presencia del sobrenadante inactivado mediante altas temperaturas, lo que sugiere que existen otras moléculas solubles citotóxicas, además del TNF α , implicadas en la muerte del MM por parte de los MØ-GM.

Puesto que los resultados obtenidos sugerían que había más moléculas implicadas en la citotoxicidad mediada por el MØ-GM sobre las células tumorales de MM, quisimos bloquear otras moléculas conocidas por presentar actividad citotóxica. Los inhibidores dirigidos hacia estas moléculas citotóxicas liberadas por los MØ-GM, como el inhibidor de proteasas, el inhibidor de NOS/ROS, α -activina o infliximab, no bloquearon la muerte inducida por estas células sobre el MM cuando se encontraron en co-cultivo directo. Sin embargo, el tratamiento conjunto con todos los inhibidores fue capaz de disminuir la muerte celular del MM cuando se encontraban cultivadas únicamente en presencia del sobrenadante de los MØ-GM. En los co-cultivos célula-célula actúan mecanismos de citotoxicidad tanto directos, dependientes de contacto celular, como indirectos, por esta razón una inhibición dirigida únicamente hacia el bloqueo de los mediadores citotóxicos indirectos no es suficiente para conseguir una reversión de la muerte del MM. En este sentido, para poder inhibir la muerte inducida por el MØ sobre el MM en los co-cultivos directos habría que explorar los mecanismos de muerte

dependientes de contacto celular, inhibiendo moléculas como la calreticulina (Feng et al., 2015).

Como ya se ha expuesto anteriormente, el principal objetivo de este estudio se centró en la repolarización de los MØ pro-tumorales en MØ anti-tumorales. La reprogramación de los MØ-M con la citoquina pro-M1 GM-CSF indujo una baja actividad tumoricida en comparación con la habilidad mostrada por los MØ-GM diferenciados directamente desde monocitos, lo que sugiere que los MØ-M ya diferenciados no son tan plásticos como sus precursores monocíticos. Aunque la plasticidad es una característica muy importante del linaje monocítico, la diferenciación de monocito a MØ comprende cambios importantes a nivel epigenético y metabólico, además, estas células presentan un componente adaptativo consistente en el desarrollo de una memoria innata que se conoce con el nombre de “inmunidad entrenada”, lo que podría explicar la incompleta repolarización mostrada desde el MØ de tipo M2 hacia un MØ de tipo M1 únicamente mediante la estimulación con la citoquina GM-CSF (Netea et al., 2011; Saeed et al., 2014). Por este motivo, se quiso reforzar la reprogramación del MØ con el fin de bloquear las señales M2, tanto autocrinas como paracrinas, mediante la inhibición de la señalización de M-CSF o de MIF, ambas muy abundantes en el microambiente tumoral cuya presencia puede estar revirtiendo constantemente la polarización del MØ de tipo M1 terapéutico. La inhibición de la señalización de M-CSF para la repolarización de los MØ en tumores ha sido una de las primeras estrategias terapéuticas utilizadas. La mayoría de los trabajos que han utilizado esta aproximación terapéutica han mostrado como la inhibición de M-CSF o de su receptor CSF-1r en modelos de xenotransplante de ratón causa una depleción de los TAM, debido a que se produce una disminución en el reclutamiento de los MØ a la zona tumoral y como consecuencia, se produce una disminución de la densidad de esta población en el compartimento tumoral (DeNardo et al., 2011). Sin embargo, una depleción del TAM no siempre es necesaria para lograr un efecto terapéutico, en cambio, una repolarización del MØ tumoral hacia un fenotipo capaz de eliminar las funciones pro-tumorales y que tal vez aumente sus capacidades anti-tumorales, puede ofrecer opciones terapéuticas más eficaces y duraderas, que la eliminación del TAM (Garris and Pittet, 2013; Long and Beatty, 2013). De hecho, el uso del inhibidor del receptor de M-CSF BLZ945 es capaz de conseguir un efecto

terapéutico notable en un modelo xenogénico de glioma en ratón a través de la re-educación del microambiente del tumor, disminuyendo tanto la expresión de los marcadores M2 en la población de MØ tumorales, como las funciones pro-tumorales de estos TAMs (Pyonteck et al., 2013). De la misma manera el uso de un agonista de CD40, molécula coestimuladora presente en la superficie de las células presentadoras de antígenos, resultó en un aumento de la regulación y expresión del MHC de clase II y de la molécula coestimuladora CD86 en los TAMs, lo que promovió una regresión tumoral en ratones y pacientes de cáncer pancreático (Beatty et al., 2011; Panni et al., 2013). En este sentido una reprogramación del TAM hacia un fenotipo anti-tumoral podría incrementar además la respuesta de la inmunidad adaptativa, con lo que el efecto anti-tumoral sería mas eficaz y duradero que la simple depleción de TAM.

137

Como el tratamiento sencillo con los agentes pro-M1 o anti-M2 tenía efectos parciales en la reprogramación del MØ, el siguiente paso consistió en la combinación de ambos agentes con el fin de conseguir un efecto sinérgico y una repolarización más completa. Para ello se utilizó la citoquina GM-CSF junto con la inhibición de la citoquina M-CSF o junto con la inhibición del factor MIF. Para la inhibición de M-CSF se utilizaron diferentes aproximaciones, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal bloqueante α -M-CSF y dos moléculas de bajo peso molecular inhibidoras de la fosforilación del dominio tirosin-kinasa de su receptor (CSF-1r), GW2580 y KI20227. El doble tratamiento de GM-CSF junto con las moléculas bloqueantes de M-CSF logró una repolarización del MØ-M a nivel funcional, induciendo la muerte en las células de MM en los experimentos de co-cultivo. No obstante, a nivel de expresión génica, esta combinación no resultó en un efecto aditivo sobre el aumento causado por el tratamiento único con GM-CSF en el marcador M1 INHBA, el cual codifica la expresión de la proteína activina A, considerada por ser uno de los factores claves en la polarización del MØ hacia un fenotipo M1 bajo la estimulación con GM-CSF (Sierra-Filardi et al., 2011). En concordancia con estos datos obtenidos se ha descrito que el uso de la doble combinación GM-CSF más la inhibición de M-CSF tampoco indujo un cambio en la expresión de marcadores M1/M2 en MØ F4/80 asilados de tumores de carcinoma de colón en modelos de ratón (Kitoh et al., 2011). Por otra parte, los tratamientos dirigidos a bloquear M-CSF o su receptor afectan no sólo a los TAM sino también al número de macrófagos presentes en muchos tejidos provocando

monocitopenia severa lo que desemboca en efectos secundarios no deseados, como aumento de infecciones oportunistas (Wiktor-Jedrzejczak and Gordon, 1996). Una estrategia más atractiva es buscar dianas terapéuticas más selectivas de TAMs, que no modifiquen de forma general al resto de la población de MØ. En este sentido, el factor MIF ha sido recientemente descrito como un factor derivado tumoral pro-M2, cuyo bloqueo mejora la supervivencia en modelos de leucemia linfocítica crónica y de melanoma (Reinart et al., 2013; Yaddanapudi et al., 2013). De hecho, el tratamiento combinado con GM-CSF y el inhibidor de MIF 4-IPP mostró los mejores efectos cooperativos en el cambio de M2 hacia M1 tanto a nivel génico, como de proteína, como a nivel funcional. El silenciamiento de MIF y el uso de un segundo inhibidor de este factor, conocido como Chicago Sky blue (CSB), consiguieron reproducir los resultados obtenidos con el 4-IPP sobre la repolarización del MØ-M a nivel génico. Además, el uso del inhibidor CSB logró también reproducir los cambios a nivel de proteína y funcional, sugiriendo que los efectos observados eran específicos de la inhibición de la vía de MIF.

En los MØ la polarización está asociada con un cambio en el metabolismo de la glucosa, ya que los MØ de tipo M1 convierten prácticamente todo el piruvato obtenido en lactato y sin embargo en los MØ de tipo M2 el piruvato entraría en el ciclo de Krebs, para después realizar la fosforilación oxidativa (Kelly and O'Neill, 2015). AMPK es un importante sensor metabólico de la célula, ya que regula el proceso de glicólisis y el transporte de glucosa durante el estrés celular (Russell et al., 2004). En relación a esta proteína AMPK en MØ se ha descrito que su activación dirige la señalización de las vías que suprimen las respuestas pro-inflamatorias, promoviendo la polarización del MØ hacia un fenotipo anti-inflamatorio (Sag et al., 2008). Nuestros datos muestran que el uso tanto de GM-CSF como de 4-IPP en los MØ-M y en mayor medida la combinación de ambos, reducen los niveles de activación de AMPK, lo que es consistente con la generación de un fenotipo proinflamatorio a nivel metabólico tras el tratamiento utilizado en estas células (Sag et al., 2008).

Puesto que MIF ha sido descrito como un factor multifuncional que actúa a través de distintos complejos de receptores dependiendo del contexto en el que se encuentre, quisimos evaluar los receptores asociados a esta molécula implicados en el proceso de repolarización del

MØ. El estudio del efecto de moléculas bloqueantes de estos receptores en la repolarización del MØ-M reveló que el uso del anticuerpo anti-CD74 y del inhibidor CCX733 fueron las moléculas que mejor mimetizaron el efecto causado por el tratamiento con el 4-IPP, ya que fueron capaces de disminuir de manera significativa los niveles de *FOLR2* y por otro lado, en conjunto con el GM-CSF aumentar los niveles de *INHIBA* y *EGLN3*. Estos resultados sugieren que MIF contribuye a la polarización del MØ de manera autocrina principalmente a través de los receptores CD74 y CXCR7.

Por último y de manera destacada, la novedosa combinación GM-CSF+4-IPP demostró un notable beneficio terapéutico en varios modelos murinos xenotransplantados de MM. En el modelo sistémico, obtenido mediante la inyección intravenosa de las células tumorales, disminuyó el porcentaje de células de MM infiltradas en la MO y en los modelos subcutáneos (realizados en ratones NSG y SCID) el doble tratamiento logró disminuir el volumen tumoral. Además el efecto observado era dependiente de la población de MØ, ya que el uso de liposomas de clodronato para la depleción de los TAMs hizo que el doble tratamiento GM-CSF+4-IPP no produjera efectos terapéuticos beneficiosos. Asimismo, los TAMs aislados de los ratones tratados con esta combinación mostraron un aumento en los niveles de expresión de marcadores M1 con una recíproca disminución en los niveles de expresión de los marcadores M2, en comparación con los ratones control.

En conjunto, estos resultados muestran que las estrategias de reprogramación de los MØ a través de la inhibición por un lado de señales M2, como M-CSF o MIF y una estimulación por otro lado de señales M1, pueden actuar de manera sinérgica en la repolarización del MØ para adquirir un fenotipo citotóxico y anti-tumoral pudiendo proporcionar un beneficio clínico significativo en los pacientes de MM.

CONCLUSIONES

1. Los MØ-M son capaces de proteger a las células tumorales de MM de una muerte espontánea y/o inducida con agentes anti-tumorales como bortezomib. Por el contrario, los MØ-GM son citotóxicos para las células de MM, tanto para las líneas celulares como para células primarias de paciente, induciendo tanto muerte celular por necrosis como por apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de contacto célula-célula.
2. Los MØ-GM son capaces de inhibir el crecimiento de las células de MM in vitro y limitar el crecimiento tumoral in vivo, por el contrario los MØ-M inducen la proliferación de las células tumorales in vitro y promueven el crecimiento tumoral in vivo.
3. Existe un proceso de cross-activación entre las células de MM y los MØ-GM cuando se encuentran en co-cultivo que conlleva como consecuencia la liberación de TNF α y de IL-12, mediadores solubles citotóxicos implicados en la muerte inducida por los MØ-GM sobre ciertas líneas de MM.
4. Los TAMs asociados a MM presentan un fenotipo M2 y existe una abundante expresión del factor MIF y su receptor CD74 en el microambiente tumoral de la MO de muestras de pacientes con MM.
5. El uso de un estímulo único pro-M1 como GM-CSF o el bloqueo único de señales M2, como MIF o M-CSF, muestran efectos parciales en la reprogramación del MØ.
6. La combinación GM-CSF+4-IPP induce la repolarización in vitro del MØ pro-tumoral de tipo M2 hacia un MØ de tipo M1 anti-tumoral tanto a nivel génico y de proteína como a nivel funcional.
7. MIF señala principalmente a través de los receptores CD74 y CXCR7 en la polarización alternativa del MØ.

8. El uso del tratamiento combinado GM-CSF+4-IPP promueve una respuesta terapéutica, que es dependiente de la población de MØ, en ratones xenogénicos de MM, e induce además el aumento de marcadores de tipo M2 y una recíproca disminución de marcadores M1 en TAMs aislados de tumores tratados con esta doble combinación.
9. El uso de tratamientos combinados que incluyen estímulos pro-M1 e inhiben señales M2 ejercen un efecto cooperativo en la repolarización de los MØ para el tratamiento del MM.

BIBLIOGRAFÍA

Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R., and Metz, C.N. (2001). Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *Journal of immunology* 166, 747-753.

Alampour-Rajabi, S., El Bounkari, O., Rot, A., Muller-Newen, G., Bachelier, F., Gawaz, M., Weber, C., Schober, A., and Bernhagen, J. (2015). MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J* 29, 4497-4511.

Andersen, M.N., Abildgaard, N., Maniecki, M.B., Moller, H.J., and Andersen, N.F. (2014). Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 93, 41-47.

Andersen, M.N., Andersen, N.F., Rodgaard-Hansen, S., Hokland, M., Abildgaard, N., and Moller, H.J. (2015). The novel biomarker of alternative macrophage activation, soluble mannose receptor (sMR/sCD206): Implications in multiple myeloma. *Leuk Res* 39, 971-975.

Anderson, K.C. (2007). Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Exp Hematol* 35, 155-162.

Asimakopoulos, F., Kim, J., Denu, R.A., Hope, C., Jensen, J.L., Ollar, S.J., Hebron, E., Flanagan, C., Callander, N., and Hematti, P. (2013). Macrophages in multiple myeloma: emerging concepts and therapeutic implications. *Leuk Lymphoma* 54, 2112-2121.

Bai, F., Asojo, O.A., Cirillo, P., Ciustea, M., Ledizet, M., Aristoff, P.A., Leng, L., Koski, R.A., Powell, T.J., Bucala, R., et al. (2012). A novel allosteric inhibitor of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *The Journal of biological chemistry* 287, 30653-30663.

Bando, H., Matsumoto, G., Bando, M., Muta, M., Ogawa, T., Funata, N., Nishihira, J., Koike, M., and Toi, M. (2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 93, 389-396.

Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L., et al. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331, 1612-1616.

Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., Metz, C., Echtenacher, B., Peng, T., and Bucala, R. (2000). The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J Clin Invest* 106, 1291-1300.

Berardi, S., Ria, R., Reale, A., De Luisi, A., Catacchio, I., Moschetta, M., and Vacca, A. (2013). Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *J Oncol* 2013, 183602.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-744.

Bergsagel, P.L., and Kuehl, W.M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23, 6333-6338.

Bernasconi, S., Peri, G., Sironi, M., and Mantovani, A. (1991). Involvement of leukocyte (beta 2) integrins (CD18/CD11) in human monocyte tumoricidal activity. *Int J Cancer* 49, 267-273.

Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R.A., Martin, S.B., Tracey, K.J., Voelter, W., Manogue, K.R., Cerami, A., and Bucala, R. (1993). MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365, 756-759.

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., et al. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587-596.

Bianchi, G., and Munshi, N.C. (2015). Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* 125, 3049-3058.

150 Biswas, S.K., Chittezhath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol Res* 53, 11-24.

Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11, 889-896.

Bloom, B.R., and Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153, 80-82.

Bolli, N., Avet-Loiseau, H., Wedge, D.C., Van Loo, P., Alexandrov, L.B., Martincorena, I., Dawson, K.J., Iorio, F., Nik-Zainal, S., Bignell, G.R., et al. (2014). Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 5, 2997.

Bozza, M., Satoskar, A.R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A.A., Gerard, C., and David, J.R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189, 341-346.

Brimnes, M.K., Vangsted, A.J., Knudsen, L.M., Gimsing, P., Gang, A.O., Johnsen, H.E., and Svane, I.M. (2010). Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR(-)/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol* 72, 540-547.

Brock, S.E., Rendon, B.E., Yaddanapudi, K., and Mitchell, R.A. (2012). Negative regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) activity by macrophage migration inhibitory factor (MIF) family members in non-small cell lung carcinomas. *The Journal of biological chemistry* 287, 37917-37925.

Bronte, V., and Murray, P.J. (2015). Understanding local macrophage phenotypes in disease: modulating macrophage function to treat cancer. *Nat Med* 21, 117-119.

Brown, G.C., and Neher, J.J. (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* 37, 325-332.

Butowski, N., Colman, H., De Groot, J.F., Omuro, A.M., Nayak, L., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Marimuthu, A., Haidar, S., Perry, A., et al. (2016). Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol* 18, 557-564.

Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C.N., Spiegel, L.A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., and Bucala, R. (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377, 68-71.

Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179, 1895-1902.

Calandra, T., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 791-800.

Cavo, M. (2006). Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 20, 1341-1352.

Claudio, J.O., Masih-Khan, E., Tang, H., Goncalves, J., Voralia, M., Li, Z.H., Nadeem, V., Cukerman, E., Francisco-Pabalan, O., Liew, C.C., et al. (2002). A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood* 100, 2175-2186.

151

Conway, J.G., McDonald, B., Parham, J., Keith, B., Rusnak, D.W., Shaw, E., Jansen, M., Lin, P., Payne, A., Crosby, R.M., et al. (2005). Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16078-16083.

Coursey, T.G., Chen, P.W., and Niederkorn, J.Y. (2012). IFN-gamma-independent intraocular tumor rejection is mediated by a macrophage-dependent process that leaves the eye intact. *J Leukoc Biol* 92, 939-950.

Chao, M.P., Majeti, R., and Weissman, I.L. (2012). Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 58-67.

David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 72-77.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995.

DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhwani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., et al. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 1, 54-67.

Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Fushida, S., Ninomiya, I., Nishimura, G.I., Yamamoto, M., Ohkuma, S., and Miwa, K. (2000). N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. *Int J Oncol* 16, 1111-1116.

Escribese, M.M., Sierra-Filardi, E., Nieto, C., Samaniego, R., Sanchez-Torres, C., Matsuyama, T., Calderon-Gomez, E., Vega, M.A., Salas, A., Sanchez-Mateos, P., et al. (2012). The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A. *Journal of immunology* 189, 1946-1954.

Espinosa, I., Beck, A.H., Lee, C.H., Zhu, S., Montgomery, K.D., Marinelli, R.J., Ganjoo, K.N., Nielsen, T.O., Gilks, C.B., West, R.B., et al. (2009). Coordinate expression of colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1-related proteins is associated with poor

prognosis in gynecological and nongynecological leiomyosarcoma. *Am J Pathol* 174, 2347-2356.

Espinosa, I., Catusus, L., E, D.A., Mozos, A., Pedrola, N., Bertolo, C., Ferrer, I., Zannoni, G.F., West, R.B., van de Rijn, M., et al. (2014). Stromal signatures in endometrioid endometrial carcinomas. *Mod Pathol* 27, 631-639.

Estechea, A., Aguilera-Montilla, N., Sanchez-Mateos, P., and Puig-Kroger, A. (2012). RUNX3 regulates intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) expression during macrophage differentiation and monocyte extravasation. *PLoS One* 7, e33313.

Fadok, V.A., de Cathelineau, A., Daleke, D.L., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 276, 1071-1077.

152 Feng, M., Chen, J.Y., Weissman-Tsukamoto, R., Volkmer, J.P., Ho, P.Y., McKenna, K.M., Cheshier, S., Zhang, M., Guo, N., Gip, P., et al. (2015). Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2145-2150.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.

Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C.N., Forsthuber, T.G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Muller, W., and Bucala, R. (2003). The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9354-9359.

Galvan-Pena, S., and O'Neill, L.A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 5, 420.

Ganguly, A., Yeltsin, E., and Robbins, J. (2003). Identification of a carcinoembryonic antigen binding protein on monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 311, 319-323.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.

Garris, C., and Pittet, M.J. (2013). Therapeutically reeducating macrophages to treat GBM. *Nat Med* 19, 1207-1208.

Gazitt, Y., Shaughnessy, P., and Montgomery, W. (1999). Apoptosis-induced by TRAIL AND TNF-alpha in human multiple myeloma cells is not blocked by BCL-2. *Cytokine* 11, 1010-1019.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Ghobrial, I.M. (2012). Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood* 120, 20-30.

Gonzalez-Dominguez, E., Samaniego, R., Flores-Sevilla, J.L., Campos-Campos, S.F., Gomez-Campos, G., Salas, A., Campos-Pena, V., Corbi, A.L., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Torres, C. (2015). CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J Leukoc Biol* 98, 453-466.

Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.

Gorgun, G.T., Whitehill, G., Anderson, J.L., Hideshima, T., Maguire, C., Laubach, J., Raje, N., Munshi, N.C., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2013). Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood* 121, 2975-2987.

Grabstein, K.H., Urdal, D.L., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Price, V.L., Cantrell, M.A., Gillis, S., and Conlon, P.J. (1986). Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* 232, 506-508.

153

Gul, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bogels, M., Braster, R., Vidarsson, G., ten Hagen, T.L., Kubes, P., and van Egmond, M. (2014). Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *J Clin Invest* 124, 812-823.

Gul, N., and van Egmond, M. (2015). Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. *Cancer Res* 75, 5008-5013.

Hebron, E., Hope, C., Kim, J., Jensen, J.L., Flanagan, C., Bhatia, N., Maroulakou, I., Mitsiades, C., Miyamoto, S., Callander, N., et al. (2013). MAP3K8 kinase regulates myeloma growth by cell-autonomous and non-autonomous mechanisms involving myeloma-associated monocytes/macrophages. *Br J Haematol* 160, 779-784.

Heuff, G., Oldenburg, H.S., Boutkan, H., Visser, J.J., Beelen, R.H., Van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., and Meyer, S. (1993). Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunol Immunother* 37, 125-130.

Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7, 585-598.

Hideshima, T., Raje, N., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2008). A review of lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of multiple myeloma. *Ther Clin Risk Manag* 4, 129-136.

Hope, C., Ollar, S.J., Heninger, E., Hebron, E., Jensen, J.L., Kim, J., Maroulakou, I., Miyamoto, S., Leith, C., Yang, D.T., et al. (2014). TPL2 kinase regulates the inflammatory milieu of the myeloma niche. *Blood* 123, 3305-3315.

Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestro, R., Carnero, A., Hannon, G.J., and Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190, 1375-1382.

Jaiswal, S., Jamieson, C.H., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., and Weissman, I.L. (2009). CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 138, 271-285.

Jensen, J.L., Rakhmilevich, A., Heninger, E., Broman, A.T., Hope, C., Phan, F., Miyamoto, S., Maroulakou, I., Callander, N., Hematti, P., et al. (2015). Tumoricidal Effects of Macrophage-Activating Immunotherapy in a Murine Model of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer immunology research* 3, 881-890.

Jourdan, M., Tarte, K., Legouffe, E., Brochier, J., Rossi, J.F., and Klein, B. (1999). Tumor necrosis factor is a survival and proliferation factor for human myeloma cells. *Eur Cytokine Netw* 10, 65-70.

Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-227.

Kawano, Y., Moschetta, M., Manier, S., Glavey, S., Gorgun, G.T., Roccaro, A.M., Anderson, K.C., and Ghobrial, I.M. (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev* 263, 160-172.

154 Kelly, B., and O'Neill, L.A. (2015). Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res* 25, 771-784.

Kim, D., Wang, J., Willingham, S.B., Martin, R., Wernig, G., and Weissman, I.L. (2012a). Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* 26, 2538-2545.

Kim, J., Denu, R.A., Dollar, B.A., Escalante, L.E., Kuether, J.P., Callander, N.S., Asimakopoulou, F., and Hematti, P. (2012b). Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 158, 336-346.

Kitoh, Y., Saio, M., Gotoh, N., Umemura, N., Nonaka, K., Bai, J., Vizkeleti, L., Torocsik, D., Balazs, M., Adany, R., et al. (2011). Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like signaling in vitro. *Int J Oncol* 38, 1409-1419.

Klasen, C., Ohl, K., Sternkopf, M., Shachar, I., Schmitz, C., Heussen, N., Hobeika, E., Levit-Zerdoun, E., Tenbrock, K., Reth, M., et al. (2014). MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. *Journal of immunology* 192, 5273-5284.

Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., et al. (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408, 211-216.

Kleemann, R., Kapurniotu, A., Mischke, R., Held, J., and Bernhagen, J. (1999). Characterization of catalytic centre mutants of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and comparison to Cys81Ser MIF. *Eur J Biochem* 261, 753-766.

Klimp, A.H., de Vries, E.G., Scherphof, G.L., and Daemen, T. (2002). A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 44, 143-161.

Kluger, H.M., Dolled-Filhart, M., Rodov, S., Kacinski, B.M., Camp, R.L., and Rimm, D.L. (2004). Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clin Cancer Res*

Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 216, 15-24.

Krockenberger, M., Dombrowski, Y., Weidler, C., Ossadnik, M., Honig, A., Hausler, S., Voigt, H., Becker, J.C., Leng, L., Steinle, A., et al. (2008). Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *Journal of immunology* 180, 7338-7348.

Kudrin, A., and Ray, D. (2008). Cunning factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. *Immunology and cell biology* 86, 232-238.

Kuehl, W.M., and Bergsagel, P.L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2, 175-187.

Kumar, S.K., Rajkumar, S.V., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Zeldenrust, S.R., Dingli, D., Russell, S.J., Lust, J.A., et al. (2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111, 2516-2520.

Kumar, S., and Rajkumar, S.V. (2008). Many facets of bortezomib resistance/susceptibility. *Blood* 112, 2177-2178.

Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M., Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., et al. (2007). Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 356, 2582-2590.

Kyle, R.A., Therneau, T.M., Rajkumar, S.V., Offord, J.R., Larson, D.R., Plevak, M.F., and Melton, L.J., 3rd (2002). A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 346, 564-569.

Labrinidis, A., Diamond, P., Martin, S., Hay, S., Liapis, V., Zinonos, I., Sims, N.A., Atkins, G.J., Vincent, C., Ponomarev, V., et al. (2009). Apo2L/TRAIL inhibits tumor growth and bone destruction in a murine model of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 15, 1998-2009.

Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *Journal of immunology* 188, 5752-5765.

Laoui, D., Van Overmeire, E., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J.A., and Raes, G. (2014a). Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol* 5, 489.

Laoui, D., Van Overmeire, E., Di Conza, G., Aldeni, C., Keirsse, J., Morias, Y., Movahedi, K., Houbrocken, I., Schouppe, E., Elkrim, Y., et al. (2014b). Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like

macrophage population. *Cancer Res* 74, 24-30.

Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R., and Laskin, J.D. (2011). Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51, 267-288.

Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11, 750-761.

Lawson, D.H., Lee, S., Zhao, F., Tarhini, A.A., Margolin, K.A., Ernstoff, M.S., Atkins, M.B., Cohen, G.I., Whiteside, T.L., Butterfield, L.H., et al. (2015a). Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *J Clin Oncol* 33, 4066-4076.

Lawson, M.A., McDonald, M.M., Kovacic, N., Hua Khoo, W., Terry, R.L., Down, J., Kaplan, W., Paton-Hough, J., Fellows, C., Pettitt, J.A., et al. (2015b). Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun* 6, 8983.

Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197, 1467-1476.

Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.

Liao, H., Bucala, R., and Mitchell, R.A. (2003). Adhesion-dependent signaling by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *The Journal of biological chemistry* 278, 76-81.

Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727-740.

Liu, M., and Bing, G. (2011). Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011, 327089.

Long, K.B., and Beatty, G.L. (2013). Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2, e26860.

Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., and Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 4, 449-460.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555.

Mark, T., Martin, P., Leonard, J.P., and Niesvizky, R. (2009). Milatuzumab: a promising new agent for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* 18, 99-104.

- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology* 177, 7303-7311.
- Merk, M., Mitchell, R.A., Endres, S., and Bucala, R. (2012). D-dopachrome tautomerase (D-DT or MIF-2): doubling the MIF cytokine family. *Cytokine* 59, 10-17.
- Meyer-Siegler, K., and Hudson, P.B. (1996). Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 48, 448-452.
- Meyer-Siegler, K.L., Bellino, M.A., and Tannenbaum, M. (2002). Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 94, 1449-1456.
- Mirnikjoo, B., Balasubramanian, K., and Schroit, A.J. (2009a). Mobilization of lysosomal calcium regulates the externalization of phosphatidylserine during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 6918-6923.
- Mirnikjoo, B., Balasubramanian, K., and Schroit, A.J. (2009b). Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 284, 22512-22516.
- Mitchell, R.A. (2004). Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumorigenesis. *Cell Signal* 16, 13-19.
- Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2000). Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol* 10, 359-366.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.
- Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W. (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355-361.
- Nguyen, M.T., Beck, J., Lue, H., Funfzig, H., Kleemann, R., Koolwijk, P., Kapurniotu, A., and Bernhagen, J. (2003). A 16-residue peptide fragment of macrophage migration inhibitory factor, MIF-(50-65), exhibits redox activity and has MIF-like biological functions. *The Journal of biological chemistry* 278, 33654-33671.
- Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49-61.
- Odh, G., Hindemith, A., Rosengren, A.M., Rosengren, E., and Rorsman, H. (1993). Isolation of a new tautomerase monitored by the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole. *Biochemical and biophysical research communications* 197, 619-624.
- Ohno, H., Kubo, K., Murooka, H., Kobayashi, Y., Nishitoba, T., Shibuya, M., Yoneda, T., and Isoe, T. (2006). A c-fms tyrosine kinase inhibitor, Ki20227, suppresses osteoclast differentiation and osteolytic bone destruction in a bone metastasis model. *Mol Cancer Ther* 5, 2634-2643.
- Panchabhai, S., Kelemen, K., Ahmann, G., Sebastian, S., Mantei, J., and Fonseca, R. (2016). Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. *Leukemia* 30, 951-954.

Panni, R.Z., Linehan, D.C., and DeNardo, D.G. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. *Immunotherapy* 5, 1075-1087.

Puig-Kroger, A., Sierra-Filardi, E., Dominguez-Soto, A., Samaniego, R., Corcuera, M.T., Gomez-Aguado, F., Ratnam, M., Sanchez-Mateos, P., and Corbi, A.L. (2009). Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* 69, 9395-9403.

Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., et al. (2013). CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 19, 1264-1272.

Pyonteck, S.M., Gadea, B.B., Wang, H.W., Gocheva, V., Hunter, K.E., Tang, L.H., and Joyce, J.A. (2012). Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene* 31, 1459-1467.

158 Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19, 1423-1437.

Rajkumar, S.V., Hayman, S., Gertz, M.A., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Greipp, P.R., Geyer, S., Iturria, N., Fonseca, R., Lust, J.A., et al. (2002). Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. *J Clin Oncol* 20, 4319-4323.

Rajkumar, S.V., Leong, T., Roche, P.C., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Witzig, T.E., Kyle, R.A., Gertz, M.A., et al. (2000). Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 6, 3111-3116.

Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445-455.

Reinart, N., Nguyen, P.H., Boucas, J., Rosen, N., Kvasnicka, H.M., Heukamp, L., Rudolph, C., Ristovska, V., Velmans, T., Mueller, C., et al. (2013). Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood* 121, 812-821.

Ribatti, D. (2013). Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. *Immunol Lett* 152, 83-88.

Richard, V., Kindt, N., and Saussez, S. (2015). Macrophage migration inhibitory factor involvement in breast cancer (Review). *Int J Oncol* 47, 1627-1633.

Richardson, P., Mitsiades, C., Laubach, J., Schlossman, R., Ghobrial, I., Hideshima, T., Munshi, N., and Anderson, K. (2009). Lenalidomide in multiple myeloma: an evidence-based review of its role in therapy. *Core Evid* 4, 215-245.

Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., et al. (2003). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 348, 2609-2617.

Roccaro, A.M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., et al. (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 66, 184-191.

Roger, T., David, J., Glauser, M.P., and Calandra, T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920-924.

Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C.N., and Rorsman, H. (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* 2, 143-149.

Ruffell, B., Affara, N.I., and Coussens, L.M. (2012). Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33, 119-126.

Russell, R.R., 3rd, Li, J., Coven, D.L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F.J., Mu, J., Birnbaum, M.J., and Young, L.H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114, 495-503.

159

Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H.H., Rao, N.A., Aghajani-Refah, A., Matarese, F., Cheng, S.C., Ratter, J., Berentsen, K., van der Ent, M.A., et al. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345, 1251086.

Sag, D., Carling, D., Stout, R.D., and Suttles, J. (2008). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *Journal of immunology* 181, 8633-8641.

Sant, A.J., Cullen, S.E., and Schwartz, B.D. (1985). Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *Journal of immunology* 135, 416-422.

Scavelli, C., Nico, B., Cirulli, T., Ria, R., Di Pietro, G., Mangieri, D., Bacigalupo, A., Mangialardi, G., Coluccia, A.M., Caravita, T., et al. (2008). Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* 27, 663-674.

Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J., and Rietschel, E.T. (1995). Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 164, 383-389.

Scholl, S.M., Pallud, C., Beuvon, F., Hacene, K., Stanley, E.R., Rohrschneider, L., Tang, R., Pouillart, P., and Lidereau, R. (1994). Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *J Natl Cancer Inst* 86, 120-126.

Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., et al. (2006). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25, 595-606.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.

- Sierra-Filardi, E., Puig-Kroger, A., Blanco, F.J., Nieto, C., Bragado, R., Palomero, M.I., Bernabeu, C., Vega, M.A., and Corbi, A.L. (2011). Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117, 5092-5101.
- Soler Palacios, B., Estrada-Capetillo, L., Izquierdo, E., Criado, G., Nieto, C., Municio, C., Gonzalez-Alvaro, I., Sanchez-Mateos, P., Pablos, J.L., Corbi, A.L., et al. (2015). Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol* 235, 515-526.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065-1073.
- Starlets, D., Gore, Y., Binsky, I., Haran, M., Harpaz, N., Shvidel, L., Becker-Herman, S., Berrebi, A., and Shachar, I. (2006). Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107, 4807-4816.
- Stein, R., Qu, Z., Cardillo, T.M., Chen, S., Rosario, A., Horak, I.D., Hansen, H.J., and Goldenberg, D.M. (2004). Antiproliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal antibody, hLL1, on B-cell malignancies. *Blood* 104, 3705-3711.
- Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5191-5196.
- Suyani, E., Sucak, G.T., Akyurek, N., Sahin, S., Baysal, N.A., Yagci, M., and Haznedar, R. (2013). Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma. *Ann Hematol* 92, 669-677.
- Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J., and Sakai, M. (1996). Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 3, 259-266.
- Takano, R., Nose, M., Kanno, H., Nishihira, T., Hiraizumi, S., Kobata, A., and Kyogoku, M. (1990). Recognition of N-glycosidic carbohydrates on esophageal carcinoma cells by macrophage cell line THP-1. *Am J Pathol* 137, 393-401.
- Tugues, S., Burkhard, S.H., Ohs, I., Vrohlings, M., Nussbaum, K., Vom Berg, J., Kulig, P., and Becher, B. (2015). New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* 22, 237-246.
- Tveita, A.A., Schjesvold, F., Haabeth, O.A., Fauskanger, M., and Bogen, B. (2015). Tumors Escape CD4+ T-cell-Mediated Immunosurveillance by Impairing the Ability of Infiltrating Macrophages to Indirectly Present Tumor Antigens. *Cancer Res* 75, 3268-3278.
- Tyurina, Y.Y., Basova, L.V., Konduru, N.V., Tyurin, V.A., Potapovich, A.I., Cai, P., Bayir, H., Stoyanovsky, D., Pitt, B.R., Shvedova, A.A., et al. (2007). Nitrosative stress inhibits the aminophospholipid translocase resulting in phosphatidylserine externalization and macrophage engulfment: implications for the resolution of inflammation. *The Journal of biological chemistry* 282, 8498-8509.
- Urban, J.L., Shepard, H.M., Rothstein, J.L., Sugarman, B.J., and Schreiber, H. (1986). Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated

macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5233-5237.

Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1991). Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 51, 3062-3066.

van Rooijen, N., Sanders, A., and van den Berg, T.K. (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193, 93-99.

Verjans, E., Noetzel, E., Bektas, N., Schutz, A.K., Lue, H., Lennartz, B., Hartmann, A., Dahl, E., and Bernhagen, J. (2009). Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer* 9, 230.

Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ* 22, 1727-1741.

Weiser, W.Y., Temple, P.A., Witek-Giannotti, J.S., Remold, H.G., Clark, S.C., and David, J.R. (1989). Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7522-7526.

Weiskopf, K., and Weissman, I.L. (2015). Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* 7, 303-310.

White, E.S., Flaherty, K.R., Carskadon, S., Brant, A., Iannettoni, M.D., Yee, J., Orringer, M.B., and Arenberg, D.A. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and CXC chemokine expression in non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 9, 853-860.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Jr., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4828-4832.

Willingham, S.B., Volkmer, J.P., Gentles, A.J., Sahoo, D., Dalerba, P., Mitra, S.S., Wang, J., Contreras-Trujillo, H., Martin, R., Cohen, J.D., et al. (2012). The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6662-6667.

Winner, M., Meier, J., Zierow, S., Rendon, B.E., Crichlow, G.V., Riggs, R., Bucala, R., Leng, L., Smith, N., Lolis, E., et al. (2008). A novel, macrophage migration inhibitory factor suicide substrate inhibits motility and growth of lung cancer cells. *Cancer Res* 68, 7253-7257.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455.

Xia, H.H., Yang, Y., Chu, K.M., Gu, Q., Zhang, Y.Y., He, H., Wong, W.M., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Yuen, M.F., et al. (2009). Serum macrophage migration-inhibitory factor as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Cancer* 115, 5441-5449.

Xin, D., Rendon, B.E., Zhao, M., Winner, M., McGhee Coleman, A., and Mitchell, R.A. (2010). The MIF homologue D-dopachrome tautomerase promotes COX-2 expression through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res* 8, 1601-

Yaddanapudi, K., Putty, K., Rendon, B.E., Lamont, G.J., Faughn, J.D., Satoskar, A., Lasnik, A., Eaton, J.W., and Mitchell, R.A. (2013). Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. *Journal of immunology* 190, 2984-2993.

Zaidi, M.R., and Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res* 17, 6118-6124.

Zaynagetdinov, R., Sherrill, T.P., Polosukhin, V.V., Han, W., Ausborn, J.A., McLoed, A.G., McMahon, F.B., Gleaves, L.A., Degryse, A.L., Stathopoulos, G.T., et al. (2011). A critical role for macrophages in promotion of urethane-induced lung carcinogenesis. *Journal of immunology* 187, 5703-5711.

162 Zheng, Y., Cai, Z., Wang, S., Zhang, X., Qian, J., Hong, S., Li, H., Wang, M., Yang, J., and Yi, Q. (2009). Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood* 114, 3625-3628.

Zheng, Y., Yang, J., Qian, J., Qiu, P., Hanabuchi, S., Lu, Y., Wang, Z., Liu, Z., Li, H., He, J., et al. (2013). PSGL-1/selectin and ICAM-1/CD18 interactions are involved in macrophage-induced drug resistance in myeloma. *Leukemia* 27, 702-710.

Zhou, Q., Yan, X., Gershan, J., Orentas, R.J., and Johnson, B.D. (2008). Expression of macrophage migration inhibitory factor by neuroblastoma leads to the inhibition of antitumor T cell reactivity in vivo. *Journal of immunology* 181, 1877-1886.

ANEXOS

PUBLICACIONES



LYMPHOID NEOPLASIA

Q:A1

Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma

Alejandra Gutiérrez-González,¹ Mónica Martínez-Moreno,² Rafael Samaniego,¹ Noemí Arellano-Sánchez,²Laura Salinas-Muñoz,¹ Miguel Reloso,¹ Antonio Valeri,³ Joaquín Martínez-López,³ Ángel L. Corbí,² Andrés Hidalgo,⁴Q:1 Ángeles García-Pardo,² Joaquín Teixidó,² and Paloma Sánchez-Mateos¹

Q:2

¹Section of Immuno-oncology, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Complutense University School of Medicine, Madrid, Spain;²Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain; ³Section of Hematology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; and ⁴Area of Cell and Developmental Biology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

Key Points

Q:3

- We report strategies to reprogram macrophages as a novel approach to treat MM mouse models using pro-M1 and blocking M2 signals.

Q:4

- MIF is upregulated in the bone marrow microenvironment of MM patients and plays an autocrine role in protumoral MØ polarization through CD74 and CXCR7.

Q:5

Tumor-associated macrophages (TAM) are important components of the multiple myeloma (MM) microenvironment that support malignant plasma cell survival and resistance to therapy. It has been proposed that macrophages (MØ) retain the capacity to change in response to stimuli that can restore their antitumor functions. Here, we investigated several approaches to reprogram MØ as a novel therapeutic strategy in MM. First, we found tumor-limiting and tumor-supporting capabilities for monocyte-derived M1-like MØ and M2-like MØ, respectively, when mixed with MM cells, both in vitro and in vivo. Multicolor confocal microscopy revealed that MM-associated MØ displayed a predominant M2-like phenotype in the bone marrow of MM patient samples, and a high expression of the pro-M2 cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). To reprogram the protumoral M2-like MØ present in MM toward antitumoral M1-like MØ, we tested the pro-M1 cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) plus blockade of the M2 cytokines macrophage colony-stimulating factor or MIF. The combination of GM-CSF plus the MIF inhibitor 4-iodo-6-phenyl-pyrimidine achieved the best reprogramming responses toward an M1 profile, at both gene and protein expression levels, as well as remarkable tumoricidal effects. Furthermore, this combined treatment

elicited macrophage-dependent therapeutic responses in MM xenograft mouse models, which were linked to upregulation of M1 and reciprocal downregulation of M2 macrophage markers. Our results reveal the therapeutic potential of reprogramming macrophages in the context of MM. (*Blood*. 2016;00(00):1-12)

Introduction

Multiple myeloma (MM) is an incurable hematologic neoplasia characterized by accumulation in the bone marrow (BM) of malignant plasma cells that produce monoclonal proteins and cause bone lesions, renal disease, and immunodeficiency.¹ Survival of malignant plasma cells is supported by interactions with the BM microenvironment (cells, extracellular matrix, and soluble factors), where macrophages (MØ) represent an important component.^{2,3} Tumor-associated macrophages (TAM) and related myeloid-derived suppressor cells protect MM cells from spontaneous and chemotherapy-induced apoptosis and provide an immunosuppressive microenvironment.^{4,5} In addition, TAM participate in complex paracrine loops with stromal and endothelial cells, promoting MM survival and angiogenesis through release of vascular endothelial growth factor and vasculogenic mimicry.⁶⁻⁸ Indeed, several studies have shown that MM patients with high BM-MØ infiltration have poor prognosis.^{9,10} Despite their protumoral actions, MØ in the myeloma niche display inherent tumoricidal potential, as demonstrated by the use of anti-CD47 antibodies that block “don’t eat me” signals and elicit MØ-mediated myeloma regression.¹¹ Moreover, T-helper

1-activated MØ are important effector cells mediating antitumor CD4⁺ T-cell responses in myeloma models.¹² Interestingly, macrophage-activating immunotherapy using CD40 plus Toll-like receptor ligation has shown clinical benefit in a MM murine model.¹³

MØ therefore have great plasticity and can differentiate into several functional states in response to microenvironmental signals.¹⁴ Using different activation stimuli in vitro, MØ have been classified into 2 major polarized states: M1-MØ refers to classically activated MØ by cytokines such as interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), whereas M2-MØ refers to alternatively activated MØ by interleukin-4 (IL-4), IL-13, or IL-10.¹⁵ M1-MØ have remarkable tumoricidal activity through secretion of cytotoxic factors (type I interferons, TNF- α , reactive nitrogen/oxygen species) and phagocytosis.^{16,17} Notably, M1-MØ can initiate specific antitumor immune responses through high expression of the major compatibility complex and costimulatory molecules for efficient antigen presentation and proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-23) to stimulate cytotoxic T and natural killer

Submitted 26 January 2016; accepted 4 September 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 13 September 2016; DOI 10.1182/blood-2016-01-695395.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734.

© 2016 by The American Society of Hematology

VÍDEOS REALIZADOS POR MICROSCOPÍA



Videos 1 y 2 realizados por microscopía de los co-cultivos MM + MØ-GM o MØ-M, respectivamente (Véanse en CD adjuntado al final del volumen de la tesis doctoral).

Se capturaron imágenes (a intervalos de 10 minutos durante 4 horas) de las células NCI-H929 cultivadas con los MØ-GM o MØ-M en presencia de Anexina V y yoduro de propidio (imágenes de fluorescencia, verde y rojo, respectivamente). Los MØ se tiñeron con CFSE y se muestran en azul superpuestos sobre las imágenes de campo claro. Las imágenes de fluorescencia y las de campo claro se unieron de manera consecutiva en ambos videos. Se observa una rápida adquisición simultánea de AnxV/YP en las células de MM co-cultivadas con los MØ-GM (**Vídeo 1**), indicativo de muerte celular por necrosis (una vez que la membrana plasmática se rompe no sólo el YP penetra en el interior de la célula sino que también se incorpora la AnxV). También se observa formación de cuerpos apoptóticos y contracción del cuerpo celular en las células de MM cultivadas con los MØ-GM, indicativo de muerte celular por apoptosis (imágenes en campo claro, **Vídeo 1**). Por el contrario, no se detectó muerte celular en las células de MM cultivadas con los MØ-M (**Vídeo 2**).